

Chromatographic resins and methods for using same

Publication number: JP10506987 (T)

Publication date: 1998-07-07

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: B01D15/08; B01J20/26; B01J20/285; B01J20/289; B01J20/32; B01J39/26; C07K1/00; C07K1/18; C08F220/06; C08F8/00; C12N9/56; C12N9/64; G01N30/88; B01D15/08; B01J20/22; B01J20/281; B01J20/30; B01J39/26; C07K1/00; C08F220/00; C08F8/00; C12N9/52; C12N9/64; G01N30/00; (IPC1-7): B01D15/08; B01J20/26; B01J39/06; C07K1/18; C08F220/06; C08F8/00; C12N9/56; C12N9/64; G01N30/48; G01N30/88

- European: B01D15/08; B01J20/289; B01J20/32; B01J39/26; C07K1/00; C12N9/56; C12N9/64F2C23M1; C12N9/64F2C23M4

Application number: JP19950510784T 19950920

Priority number(s): WO1995NZ00091 19950920; US19940311100 19940923

Also published as:

US5945520 (A)
US5652348 (A)
PT783366 (E)
NZ293707 (A)
WO9609116 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 10506987 (T)

Abstract of corresponding document: US 5945520 (A)

Disclosed are rationally designed mixed mode resins which are useful in recovering a target compound from an aqueous solution and methods for use of such resins. The resins described herein have a hydrophobic character at the pH of binding of the target compound and a hydrophilic and/or electrostatic character at the pH of desorption of the target compound from the resin and are specifically designed to bind the target compound from an aqueous solution at both a low and high ionic strength.



Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506987

(43) 公表日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号

F I

G 0 1 N 30/48

G 0 1 N 30/48

P

B 0 1 D 15/08

B 0 1 D 15/08

B 0 1 J 20/26

B 0 1 J 20/26

H

39/06

39/06

C 0 8 F 8/00

C 0 8 F 8/00

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-510784
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995) 9月20日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 3月24日
 (86) 国際出願番号 PCT/NZ 95/00091
 (87) 国際公開番号 WO 96/09116
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 3月28日
 (31) 優先権主張番号 08/311, 100
 (32) 優先日 1994年9月23日
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP, MX, NZ

(71) 出願人 マッシー ユニヴァーシティー
 ニュージーランド国 バルマーストーン ノース (番地なし)
 (72) 発明者 パートン, シモン シー
 ニュージーランド国 バルマーストーン ノース プライアント ストリート 37
 (72) 発明者 ハガーティ, ネイル ワード
 ニュージーランド国 バルマーストーン ノース オーバン プレイス 6
 (74) 代理人 弁理士 柳田 征史 (外1名)

最終頁に続く

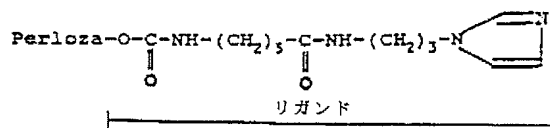
(54) 【発明の名称】 クロマトグラフ用樹脂およびその使用方法

(57) 【要約】

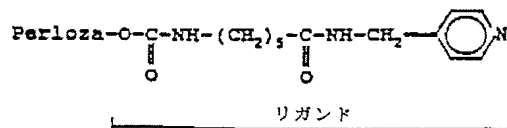
標的化合物の水性溶液からの回収に有用な、合理的に設計された混合形式樹脂、およびそのような樹脂の使用方法が開示されている。ここに記載されている樹脂は、標的化合物の結合 pH では疎水性の性質を、そして標的化合物の樹脂からの脱着 pH では親水性および/または静電的性質を有し、特に、低および高イオン強度の両方の水性溶液から標的タンパク質を結合するために設計されている。

図 7

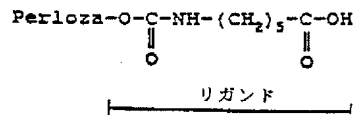
MG1



MG2



MG3



【特許請求の範囲】**1. 固体支持マトリックス、**

固体支持マトリックスに共有結合により取り付けられた選択されたイオン性リガンドまたは選択されたイオン性リガンドの混合物であって、該イオン性リガンドが、スペーサーアームおよび該スペーサーアームを介して前記マトリックスに結合されている少なくとも1つのイオン性官能基を含み、そこにおいて前記イオン性リガンドの前記固体支持マトリックス上での密度が、樹脂1ml当たり少なくとも150 μ モルおよび樹脂の乾燥重量1g当たり少なくとも1mモルの何れか小さい値より大きいもので、

前記イオン性リガンドが、前記固体支持マトリックスおよび前記標的化合物に関連して、前記樹脂の疎水的特性が第1のpHにおいて高および低イオン強度で水性培地中の標的化合物の少なくとも50%と結合するために十分であるよう選択されており、さらに、前記固体支持マトリックスに関連して、第2のpHにおける前記樹脂の親水的および／または静電气的特性が、結合した化合物をその第2のpHで脱着するために十分であるように選択されており、

前記イオン性官能基が、前記標的化合物が前記樹脂から脱着されるpHにおいて、標的化合物が前記樹脂に結合するpHでの荷電と比較して、さらに静電的に荷電するかまたは異なった極性に荷電するもの、

から成ることを特徴とする、標的化合物の結合用の樹脂。

2. 前記樹脂が、必要に応じて、前記固体支持マトリックスに共有結合により取り付けられた選択された非イオン性リガンドを含み、そしてさらに、イオン性および非イオン性リガンドの総数に基づいた非イオン性リガンドの割合が約0から約80%の範囲にあり、

前記非イオン性リガンドが、前記イオン性リガンドおよび前記固体支持マトリックスに関連して、樹脂の疎水的性質が第1のpHにおいて高および低イオン強度の水性培地中の少なくとも50%の標的化合物と結合するために十分であるように選択されており、さらに前記固体支持マトリックスに関連して、第2のpHにおける前記樹脂の親水的および／または静電气的性質が、結合した

化合物をその第2のpHにおいて脱着するのに十分であるように選択されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

3. 前記樹脂からの化合物脱着のpHにおける樹脂上の静電荷が、前記標的化合物のそのpHにおいての正味の静電荷と同じ極性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

4. 前記樹脂からの化合物脱着のpHにおける樹脂上の静電荷が、前記標的化合物のそのpHにおいての正味の静電荷と反対の極性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

5. 前記イオン性官能基がカルボキシル基、アミノ基およびフェノール基からなる群より選択されることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

6. 前記固体支持マトリックスに取り付けられた非イオン性リガンドの、イオン性および非イオン性リガンドの総数に基づく割合が0%より大きく約40%までの範囲にあることを特徴とする請求の範囲第2項記載の樹脂。

7. 前記固体支持マトリックスが架橋されていることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

8. 前記固体支持マトリックスが非イオン性であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

9. 前記固体支持マトリックスがその骨格内にイオン性官能基を有することを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

10. 前記標的化合物がタンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

11. 前記タンパク質またはペプチドがスブチリシンまたはキモシンから成る群より選択されることを特徴とする請求の範囲第10項記載の樹脂。

12. 前記リガンドの密度が、樹脂1mlあたり少なくとも約150μmolであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

13. 前記リガンドの密度が、樹脂の乾燥重量1gあたり少なくとも1mmolであることを特徴とする請求の範囲第1項記載の樹脂。

14. 標的化合物を含む水性培地から該標的化合物を分離する方法であって、該培地のpHを調整することを含む、前記培地を、前記標的化合物の少なくとも5

0%が前記樹脂と結合するために好適な条件下で請求の範囲第1項記載の樹脂に接触させる工程からなることを特徴とする方法。

15. 前記標的化合物がタンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求の範囲第14項記載の方法。

16. 前記タンパク質またはペプチドがスブチリシンまたはキモシンから成る群より選択されることを特徴とする請求の範囲第15項記載の方法。

17. 標的化合物を含む水性培地から該標的化合物を結合させて回収する方法であって、

a) 前記培地を、前記標的化合物の少なくとも50%が前記樹脂に結合するために好適な条件下で請求の範囲第1項記載の樹脂に接触させ；

b) 結合した前記標的化合物を含む前記樹脂を培地の他の成分から分離して、樹脂-培地複合体を形成し；そして、

c) 前記複合体を、前記標的化合物が樹脂から脱着するように、上記a)の培地のpHとは十分に異なったpHを有する溶出液と接触させることにより、前記結合した標的化合物を前記複合体から脱着させる各工程から成ることを特徴とする方法。

18. 前記標的化合物がタンパク質またはペプチドであることを特徴とする請求の範囲第17項記載の方法。

19. 前記タンパク質またはペプチドがスブチリシンまたはキモシンから成る群より選択されることを特徴とする請求の範囲第18項記載の方法。

20. 前記水性培地が前記樹脂と攪拌バッチ工程において接触されることを特徴とする請求の範囲第17項記載の方法。

21. 前記水性培地が前記樹脂とクロマトグラフィーカラムにおいて接触されることを特徴とする請求の範囲第17項記載の方法。

22. 前記カラムが放射状流体カラムであることを特徴とする請求の範囲第21項記載の方法。

23. 前記カラムが液状化拡張ベッドであることを特徴とする請求の範囲第21項記載の方法。

24. 前記リガンドの密度が、樹脂1mlあたり少なくとも約150μmolである

ことを特徴とする請求の範囲第17項記載の方法。

25. 前記リガンドの密度が、樹脂の乾燥重量1 gあたり少なくとも1 mモルであることを特徴とする請求の範囲第17項記載の方法。

26. 固体支持マトリックスに取り付けられているイオン性官能基を有する樹脂であって、

固体支持マトリックス；および、

イオン性官能基および、そのイオン性官能基を固体支持マトリックスに共有結合により取り付けているスペーサーアームを有するイオン性リガンドであって、そこにおいて前記イオン性官能基が、4-(アミノメチル)ピリジン、3-(アミノメチル)ピリジン、2-(アミノメチル)ピリジン、1-(3-アミノプロピル)-イミダゾール、2-(アミノメチル)-ベンズイミダゾール、4-(3-アミノプロピル)モルフォリン、フロロ、クロロ、ブロモおよびヨードからなる群より選択された1から2のハロ基を有するハロトリアミン、4-アミノ酪酸、(1S, 2S)-(+)-2-アミノ-1-フェニル-1, 3プロパンジオール、(-)-フェニルプロパノールアミン、フェニルエチルアミン、フェニルアラニンオール、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホンアミド、DL- β -ヒドロキシフェニルエチルアミン、チオサリチル酸、2-メルカプト-1-メチルイミダゾール、2-メルカプトベンズイミダゾール、4-メルカプトエチルピリジン、2-メルカプトエチルピリジン、4-メルカプト酪酸、5-メルカプトバレリアン酸、6-メルカプトヘキサノン酸、4-ヒドロキシチオフェノール、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロヒドロキシフェニル酢酸、3, 5-ジクロロサリチル酸、4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸、3-ニトロチロシン、フロロ、クロロ、ブロモ、ヨードから成る群より選択された1から2のハロ基を有するハロチロシン、およびパラ-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジンから成る群より選択された化合物から派生されたもの、

から成ることを特徴とする樹脂。

27. 前記イオン性官能基が、4-(アミノメチル)ピリジン、3-(アミノメチル)ピリジン、2-(アミノメチル)ピリジン、1-(3-アミノプロピル)

ーイミダゾール、2-（アミノメチル）-ベンズイミダゾール、4-（3-アミノプロピル）モルフォリンから成る群より選択された化合物から派生されていることを特徴とする請求の範囲第26項記載の樹脂。

28. 固体支持マトリックス上に取り付けられているイオン性官能基を有する樹脂であって、

固体支持マトリックス；および、

前記樹脂 1 ml あたり少なくとも約 150 μ mol、または前記樹脂の乾燥重量 1 g あたり少なくとも 1 mmol の何れか小さい値よりも大きな密度で前記固体支持マトリックスに取り付けられている、イオン性官能基および該イオン性官能基を前記固体支持マトリックスに取り付けているスペーサーアームを有するイオン性リガンドであって、そこにおいて前記イオン性官能基が、アミノカプロン酸、2-メルカプトピリジン、4-メルカプトピリジン、アミノエチルベンゼンスルホンアミド、チラミン、チロシンおよびヒスチジンから成る群より選択された化合物から派生されたもの、

から成ることを特徴とする樹脂。

【発明の詳細な説明】

クロマトグラフ用樹脂およびその使用方法

発明の背景

発明の分野

本発明は、標的化合物の水性溶液からの回収に有用な、合理的に設計された混合形式樹脂、およびそのような樹脂の使用方法に関するものである。ここに記載されている樹脂は、標的化合物の結合 pH では疎水性の性質を、そして標的化合物の樹脂からの放出 pH では親水性および／または静電氣的性質を有し、特に、低および高イオン強度の両方で水性溶液から標的タンパク質を結合するために設計されている。

参考文献

以下の参考文献が明細書中で [] 内の番号で言及されている：

- 1 Ochoa, J.L., "Hydrophobic (interaction) chromatography", *Biochimie*, **60**:1-15 (1978).
- 2 Yon, R.J., et al., "Protein Chromatography on Adsorbents with Hydrophobic and Ionic Groups", *Biochem J.*, **151**:281-290 (1975).
- 3 Yon, R.J., "Chromatography of Lipophilic Proteins on Adsorbents Containing Mixed Hydrophobic and Ionic Groups", *Biochem J.*, **126**:765-767 (1972).
- 4 Hofstee, B.H.J., "Hydrophobic Affinity Chromatography of Proteins", *Anal. Biochem.*, **52**:430-448 (1973).
- 5 Hofstee, B.H.J., "Protein Binding by Agarose Carrying Hydrophobic Groups in Conjunction with Charges", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**:751-757 (1973).
- 6 Bischoff, et al., "Nucleic Acid Resolution by Mixed-Mode Chromatography", *J. Chromatogr.*, **296**:329-337 (1984).

- 7 Kasche, V., et al., "Rapid Protein Purification Using Phenylbutylamine-Eupergit: a novel method for large-scale procedures", *J. Chromatogr.*, **510**: 149-154 (1990).
- 8 Sasaki, I. et al., "Hydrophobic-Ionic Chromatography", *J. Biochem.*, **86**:1537-1548 (1979).
- 9 Sasaki, I. et al., "Hydrophobic-Ionic Chromatography: Its Application to Microbial and Glucose Oxidase, Hyaluronidase, Cholesterol Oxidase, and Cholesterol Esterase", *J. Biochem.*, **91**:1555-1561 (1982).
- 10 Simons, P. C. et al., "Purification of Glutathione S-Transferases from Human Liver by Glutathione-Affinity Chromatography", *Anal. Biochem.*, **82**:334-341 (1977).
- 11 McLaughlin, "Mixed-Mode Chromatography of Nucleic Acids", *Chem. Rev.*, **89**:309-319 (1989)
- 12 Bischoff, et al., "Mixed-Mode Chromatographic Matrices for the Resolution of Transfer Ribonucleic Acids", *J. Chromatogr.*, **317**:251-261 (1984)
- 13 Champluvier, B., et al., "Dye-Ligand Membranes as Selective Adsorbents for Rapid Purification of Enzymes: A Case Study", *Biotechnol. Bioeng.*, **40**:33-40 (1992)
- 14 Butler, L.G., "Enzyme Immobilization by Adsorption on Hydrophobic Derivatives of Cellulose and Other Hydrophilic Materials", *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**:645-650 (1975).
- 15 Caldwell, K.D., et al., "Utilization of Hydrophobic Interaction for the Formation of an Enzyme Reactor Bed", *Biotechnol. Bioeng.*, **17**:613-616 (1975).
- 16 Cashion, P., et al., "Enzyme Immobilization on Tritylagarose", *Biotech. Bioeng.*, **24**:403-423 (1982).
- 17 Voutsinas, P.L., et al., "Coagulation of Skim Milk with Proteases Immobilized on Hydrophobic Carriers", *Dairy Sci.*, **66**:694-703 (1983).
- 18 Hutchinson, D.W., "The Preparation and Properties of Immobilized Dipeptidyl-aminopeptidase I (cathepsin C)", *Biochim. Biophys. Acta*, **916**:1-4 (1987).

- 19 Asenjo, J.A., et al., "Rational Design of Purification Processes for Recombinant Proteins", *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 646:334-356 (1991)
- 20 Ruann, R.C., et al., "Dual-Functional Affinity Protein Purification", *Biotechnol. Prog.*, 4:107-112 (1988)
- 21 Teichberg, V.I., "Affinity-Repulsion Chromatography", *J. Chromatogr.*, 510:49-57 (1990)
- 22 Johansson, G., et al., "Affinity Partition Between Aqueous Phases - A Tool for Large-Scale Purification of Enzymes", *J. Biotechnol.*, 11:135-142 (1989)
- 23 Ortin, A., et al., "Large Scale Extraction of a α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin from Bovine Whey by Precipitation with Polyethylene Glycol and Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems", *Prep. Biochem.*, 22:53-66 (1992)
- 24 Heath, C.A. et al., "Synthetic Membranes in Biotechnology: Realities and Possibilities", *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, 47:45-88 (1992)
- 25 Luong, J.H.T., et al., "Synthesis and Characterization of a Water-Soluble Affinity Polymer for Trypsin Purification", *Biotechnol. Bioeng.*, 31:439-446 (1988)

上で言及された刊行物の各々の開示は、各々の、および全ての参考文献がここに参考文献として取り込まれているのと同様に、全体としてここに参考文献として取り込まれている。

技術の現状

近年、いくつかの技術が、標的化合物の水性混合物からの分離および精製を可能とするために、開発および／または最適化されてきている。このような化合物についてこれまでに用いられている分離および精製技術には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）〔1〕、吸着クロマトグラフィー等がある。そのようなクロマトグラフ技術の多様性は、標的化合物を、分離／精製の複雑さを最小化する一方で、分離および／または精製を行なう困難さを反映しており、そして、上記の技術の各々は、それらの幅広い産業的規模での利用を制限している1以上の欠点を有している。

混合形式のクロマトグラフィー用樹脂はまた、このような樹脂が疎水的な条件

下で標的化合物を結合することが可能であり、静電氣的（イオンの）または親水性条件下で樹脂から標的化合物を放出することが可能である分野で用いられている。このような混合形式樹脂の例は、Kasche, et al. [7], Bischoff, et al. [6], McLaughlin [11] および Bischoff, et al. [12] において見られる。

従来技術の混合形式のクロマトグラフィー用樹脂の典型的な問題の1つは、標的化合物の溶液において高塩濃度が用いられていない場合、あまり疎水的でない標的化合物の樹脂への結合効率がそれほど高くないことである。例えば、Kasche, et al. [7] においては、予備的なレベルでのタンパク質の樹脂への結合は、1M NaCl 溶液を用いることにより達成された。標的化合物を含む水性溶液への塩の添加に関与するクロマトグラフ技術には、産業的規模での収率を達成するためには、大量の試薬が必要であり、相当な工程を必要とするであろう。従って、高い塩濃度の使用を必要とするクロマトグラフィー用樹脂は、このような化合物の産業的な量の回収および／または精製のための最も効果的かつコスト効果を有する方法ではない。

本発明は、部分的には、1つのイオン性官能基およびリガンドを樹脂の固体支持マトリックスに共有結合で連結させている1つのスペーサーから成る特定のイオン性リガンドの利用と組み合わせされた混合形式クロマトグラフィー用樹脂上の高リガンド密度の利用により、樹脂中に、標的化合物が高および低イオン強度で樹脂に結合するような、十分な疎水性の性質を提供できるという発見に向けられている。本発明はさらに、部分的には、標的化合物の樹脂からの放出を、イオン性官能基を介した樹脂上の電荷の量を増加させるなどのために単に放出溶液のpHを変化させることによって、親水的または静電氣的（イオン性）相互作用によって達成することが可能であるという発見に向けられている。この後半の特徴は、このようなHIC樹脂への結合がしばしば不可逆的であり得る一方で、生産物回収のための扱いやすい手段を提供することにより、高密度HIC樹脂上に多大な利点を提供している。

本発明においては、イオン性リガンドは、標的化合物に関連して合理的に選択

され、それにより標的化合物の、発酵液体培地を含む水性培地からの、大規模での効果的な回収および／または精製を可能としている。ここで用いられる樹脂は、特に、固体支持マトリックスおよび、少なくとも $150 \mu\text{mol}$ ／樹脂ミリリットルかまたは 1m mol ／グラム樹脂乾燥重量の何れか小さい値より大きい密度で固体支持マトリックスに共有結合的に取り付けられた選択されたりガンドまたはリガンドの混合物を含有するものとして特徴づけられる。イオン性リガンドはスパーサーアームと少なくとも1つのイオン性官能基であってマトリックスにスパーサーアームを介して結合している官能基を有する。樹脂上で用いられるイオン性リガンドは、固体支持マトリックスおよび標的化合物に関連して、樹脂の疎水の性質が、第1のpHにおいては高および低イオン強度で水性培地中の標的化合物の少なくとも50%を結合するために十分であるように選択され、さらに、固体支持マトリックスおよび標的化合物に関連して、樹脂の親水のおよび／または静電氣的（イオンの）性質が、第2のpHにおいて、結合した化合物を放出するために十分であるように選択される。付加的にはイオン性官能基は、化合物の樹脂への結合pHにおいては部分的に静電氣的に荷電しており、化合物の樹脂からの放出pHにおいては、さらに荷電しているかまたは異なった極性に荷電している。このような部分的に荷電した樹脂は標的化合物の樹脂への結合を促進または弱めるための2次的な基礎を提供するものである。

好ましい態様においては、標的化合物が樹脂から放出されるpHでの樹脂の荷電は、そのpHにおける標的化合物の正味静電氣的荷電と同じ極性である。この実施例においては、放出は、樹脂の疎水的結合特性を相殺する電荷－電荷の反発によって成される。別の実施例においては、標的化合物の樹脂からの放出pHでの樹脂の荷電は、標的化合物と反対の極性である。何れの実施例においても、高または低イオン強度の放出溶液（溶出液等）の使用により、または、エチレンまたはプロピレングリコール等の極性減少剤の使用により達成されることが出来る。

この発明の樹脂は、以前に記述されている混合形式樹脂とは、この樹脂は少なくとも樹脂 1ml に対して $150 \mu\text{mol}$ 、または樹脂の乾燥重量 1g あたり 1m mol のうちの小さいほうの値よりも大きいリガンド密度を有するという特徴によ

り、さらに、リガンドがイオン性官能基をマトリックスに共有結合により連結し

ているスペーサーを含むという特徴により対照を成している。特に、文献中では、イオン性基は、長アルキル鎖（疎水性）セファロース樹脂への結合を弱め、より好ましい放出条件とするために、熟慮されて導入されている〔2、3〕。これらのマトリックス上のリガンド密度は1 ml あたり約15－21 μ モルと計算されている。

ポリスチレンカルボキシル樹脂（Amberlite）もまた、疎水性相互作用によるタンパク質の結合〔8、9〕およびイオン性相互作用による放出に用いられている。しかしながら、高密度のカルボキシル基が用いられているが、カルボキシル基を固体支持マトリックスに連結しているスペーサーアームはない。

同じく開示されているのは、陽性に荷電した、イソウレア基〔4、5〕を約1 ml あたり20 μ モル以下と考えられている密度で有する樹脂である。これらの樹脂は弱く疎水性であり、典型的には標的化合物の樹脂への結合のためには静電気的および疎水的相互作用を必要とする。

標的化合物の、高または低イオン強度での本発明のイオン性官能基を有する樹脂への結合は、典型的には標的化合物の結合に先立って、または標的化合物の樹脂からの放出をもたらすために溶液のイオン強度の調整を要するイオン性官能基を有する従来技術の樹脂と、対照を成す。そのような調整は、標的化合物の回収および／または精製を行なうための効果的な産業的規模の工程と一致するものではない。

発明の概要

本発明は、部分的には、例えばタンパク質やペプチド等の標的化合物の水性培地からの回収に有用である、特別に設計された混合形式クロマトグラフィー用樹脂、およびそのような樹脂の利用方法に関するものである。ここに記載されている樹脂は、固体支持マトリックス、および、イオン性リガンドからなり、そのリガンドは、イオン性官能基、およびリガンドを共有結合的に固体支持マトリックスに取り付けているスペーサーを有するものである。このイオン性官能基は、化合物の樹脂への結合 pH においては部分的に静電気的に荷電し、化合物の樹脂が

らの放出 pH においてはさらに荷電しているかまたは異なった極性の何れかに荷電している。

これらの樹脂は、少なくとも樹脂 1 ml あたり 150 μ モルまたは樹脂の乾燥重量 1 g あたり 1 mmol のいずれか少ない値よりも大きな樹脂上のイオン性リガンド密度を有し、そこにおいてイオン性リガンドが、固体支持マトリックスおよび標的化合物に関連して、樹脂の疎水的性質が、第 1 の pH において、高および低イオン強度で、水性培地中の標的化合物の 50 % を結合するために十分であるように選択されており、さらにまた、樹脂の親水的および／または静電氣的性質が、第 2 の pH において、結合した化合物を前述の pH で放出するのに十分であるように選択されているものである。

従って、その組成形態のひとつにおいては、本発明は、標的化合物を結合するための樹脂であって、

固体支持マトリックス、

選択されたイオン性リガンドまたは選択されたイオン性リガンドの混合物であって固体支持マトリックスに共有結合により結合されたもので、そのイオン性リガンドが、スペーサーアームおよび少なくとも 1 つのイオン性官能基であってスペーサーアームを介してマトリックスに結合されているものからなり、そこにおいて樹脂上のイオン性リガンドの密度が、樹脂 1 ml あたり約 150 μ モルまたは樹脂の乾燥重量 1 g あたり 1 mmol の何れか小さい値よりも大きいものであり、

そのイオン性リガンドは固体支持マトリックスおよび標的化合物に関連して、樹脂の疎水的性質が、第 1 の pH において、高および低イオン強度で、水性培地中の標的化合物の少なくとも 50 % を結合するために十分であるように選択されており、さらに固体支持マトリックスに関連して、樹脂の親水的および／または静電氣的性質が、第 2 の pH において、結合した化合物を前述の pH で放出するのに十分であるように選択されており、

そのイオン性基が、標的化合物の樹脂への結合 pH での荷電と比較して、標的化合物が樹脂から放出される pH では、さらに荷電しているかまたは異なった極

性に荷電しているかの何れかである、
ものであることを特徴とするものに向けられている。

好ましい実施例においては、このような樹脂は、付加的に、固体支持マトリッ

クスに共有結合的に取り付けられた、選択された非イオン性リガンドを有し、そこにおいて、イオン性および非イオン性リガンドの総量をベースとした、非イオン性リガンドのパーセンテージが、約0から80%の範囲にある。この態様においては、非イオン性リガンドの量はイオン性リガンドの量および固体支持マトリックスに関連して、樹脂の疎水的性質が、第1のpHにおいて、高および低イオン強度で、水性培地中の標的化合物の少なくとも50%を結合するために十分であるように選択されており、さらにまた固体支持マトリックスに関連して、樹脂の親水的および／または静電氣的性質が、第2のpHにおいて、結合した化合物を前述のpHで放出するのに十分であるように選択されている。

方法の形態の1つにおいて、本発明は、標的化合物を、標的化合物を含む水性培地から分離する方法であって、水性培地を上記の樹脂と、その標的化合物の少なくとも50%が樹脂と結合する結合に好適な条件下で接触させることから成り、培地のpHを調整することを含むものに向けられている。

本発明のさらに別の面においては、本発明は標的化合物を含む水性培地からの標的化合物の分離のための方法であって、

a) 培地を上記の樹脂と、標的化合物の少なくとも50%が樹脂に結合するのに好適な条件の下で接触させ、

b) 結合した標的化合物を含む樹脂を、他の培地成分から分離して樹脂-化合物複合体を形成し；および

c) 結合した標的化合物を複合体から、上記a)で定義された培地のpHとは十分に異なり、標的化合物を樹脂から放出させるpHを有する溶出液と接触させることにより放出させる、

各工程からなる方法に向けられている。

その組成物としての別の形態においては、本発明は、固体支持マトリックス上に取り付けられているイオン性官能基を有する新規樹脂に向けられており、該樹

脂は、

1つの固体支持マトリックス；および、

1つのイオン性官能基、および、そのイオン性官能基を固体支持マトリックスに共有結合により取り付けられている1つのスペーサーアームを有する1つのイオン

性リガンドであって、そこにおいて前記イオン性官能基が、4-（アミノメチル）ピリジン、3-（アミノメチル）ピリジン、2-（アミノメチル）ピリジン、1-（3-アミノプロピル）-イミダゾール、2-（アミノメチル）-ベンズイミダゾール、4-（3-アミノプロピル）モルフォリン、フロロ、クロロ、ブロモおよびヨードからなる群より選択された1から2のハロ基を有するハロトリアミン、4-アミノ酪酸、（1S、2S）-（+）-2-アミノ-1-フェニル-1,3-プロパンジオール、（-）-フェニルプロパノールアミン、フェニルエチルアミン、フェニルアラニンオール、4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホンアミド、DL-β-ヒドロキシフェニルエチルアミン、チオサリチル酸、2-メルカプト-1-メチルイミダゾール、2-メルカプトベンズイミダゾール、4-メルカプトエチルピリジン、2-メルカプトエチルピリジン、4-メルカプト酪酸、5-メルカプトバレリアン酸、6-メルカプトヘキサノン酸、4-ヒドロキシチオフェノール、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロヒドロキシフェニル酢酸、3,5-ジクロロサリチル酸、4-ヒドロキシー-3-ニトロ安息香酸、3-ニトロチロシン、およびフロロ、クロロ、ブロモ、ヨードから成る群より選択された1から2のハロ基を有するハロチロシン、およびパラ-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジンから成る群より選択された化合物から派生されたものであるもの、から成ることを特徴とするものである。

本発明の組成物としてのさらに別の形態においては、本発明は、固体支持マトリックス上に取り付けられているイオン性官能基を有する新規樹脂に向けられており、該樹脂は、

1つの固体支持マトリックス；および、

少なくとも樹脂1mlあたり約150μモル、または樹脂の乾燥重量1gあた

り 1 mモルの何れか小さい値よりも大きな密度で上記固体支持マトリックスに取り付けられている、1つのイオン性官能基およびそのイオン性官能基を共有結合により固体支持マトリックスに取り付けている1つのスペーサーアームを有するイオン性リガンドであって、そこにおいて前記イオン性官能基が、アミノカプロン酸、2-メルカプトピリジン、4-メルカプトピリジン、アミノエチルベンゼ

ンスルホンアミド、チラミン、チロシンおよびヒスチジンから成る群より選択された化合物から派生されたものであるもの、
から成ることを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1は、カルボニルジイミダゾール(CDI)活性化マトリックスへのリガンド取り付けを示している。

図2は、マトリックスのカルボキシル基への、リガンドのカルボジイミドカップリングを示している。

図3は、CDI-カプロン酸支持体を示している。

図4は、アミンとCDI-カプロン酸マトリックスとの縮合(反応)から由来しうる生成物を示している。

図5は、エポキシ活性化マトリックスとチオールとの反応を示している。

図6は、エポキシド活性化マトリックスとアミンとの反応で、そのイオン性アミン官能基が保持されているものを示している。

図7は、本発明において有用であるいくつかの樹脂の構造を示している。

図8は、放射状流体カラムを用いた、スブチリシンを含む粗発酵液体培地からのスブチリシンの回収の、典型的な溶出特性を示している。

発明の詳細な説明

本発明は、部分的には、樹脂を用いた水性培地からの標的化合物の回収のための合理的な方法に向けられている。本発明の方法は、部分的には、標的化合物の水性培地からの回収における利用のための樹脂の選択であって、そこにおいてその樹脂の疎水性特性が、第1のpHでは高および低イオン強度の水性培地中の標的化合物の少なくとも50%を結合するために十分であり、さらに、第2のpH

での樹脂の親水性的および／または静電気的特性が、結合した化合物をその第2のpHで放出するために十分であるものである。本発明の樹脂のイオン性リガンドは、固体支持マトリックス並びに標的化合物の静電気的電荷、pI、安定性等の特性に関連して、樹脂が、標的化合物が十分に安定である等のpH範囲に対応し

て、疎水的な性質および親水性的および／または静電気的性質を有するように選択されている。当業者は容易にこれらの変数をここにおける教示に基づいて確認することが出来る。

この態様の好ましい形態においては、選択工程は、イオン性リガンドおよびそのようなりガンドの樹脂上の密度と組みあわせて用いられる固体支持マトリックスを含むよう拡張され、そこにおいて、その選択は、標的化合物の結合および樹脂からの放出のpHにおいて樹脂全体にわたって要求される疎水性の度合に関連して成される。これに関して、固体支持マトリックスは、イオン性官能基を含まないかまたはイオン性官能基を含むかの何れかであってもよい。付加的には、イオン性官能基並びにイオン性リガンドのスペーサーアームの両方が、標的化合物の結合および放出pHでの疎水性についての更なる制御を可能としている。

この態様のさらに好ましい形態においては、選択工程は1またはそれ以上の非イオン性リガンドの、結合および放出pHにおいて樹脂全体について要求される疎水性の度合に関連した選択を含むよう拡張される。例えば、樹脂の疎水性は、結合の増加が必要である場合には、標的化合物の結合を増加させるために、固体支持マトリックスに取り付けられている非イオン性リガンドを用いることにより、そこにおいてリガンドの疎水性を制御し、調整することが出来る。例えば、非常に疎水性である、芳香族基を取り込んでいるもの等の非イオン性リガンドを、樹脂の全体の疎水性を高めるために用いてもよく、一方、より親水性である、例えばいくつかの非イオン性アルコール基（アルカノール等）を含むもの等の非イオン性リガンドを、樹脂の全体の親水性を増加させるために、樹脂への標的化合物の結合および樹脂からの化合物の放出をもたらすために必要である疎水性／親水性の要求に関連して用いることが出来る。

各々の樹脂の成分の適切な選択を成すことにより、標的化合物の樹脂への結合

のpHにおける疎水性の特徴は、結合効率を促進するため、および／または、標的化合物の樹脂への結合特異性を増加させるために合理的に選択される。同様に、樹脂の標的化合物の放出pHにおける親水性的および／または静電的（イオンの）性質も、標的化合物の樹脂からの適当な放出を確実なものとするために合理的に選択される。

本発明をより詳細に記述する前に、以下の用語を最初に定義する。

定義

用語「標的化合物」とは、特定の化合物、即ち水性溶液から単離することを望んでいる化合物である。標的化合物は、タンパク質、ペプチド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、糖類、オリゴ糖、炭水化物、ステロイド、環状芳香族化合物、ジオール、インドール誘導体、薬用化学化合物またはその中間体、1次または2次細胞代謝物、その他で有り得る。特定の標的化合物が重要なのではない。しかしながら、好ましい態様においては、標的化合物はタンパク質またはペプチド、1次または2次細胞代謝物および薬用化学中間体から成る群より選択される。

「固体支持マトリックス」または「固体マトリックス」という用語は、樹脂の固体骨格物質で、リガンドをそれ自体に共有結合で取り付けることを可能とする反応性官能基を含む物質である。骨格物質は無機的（シリカ等）でも有機的であってもよい。骨格物質が有機的である場合、固体ポリマーであることが好ましく、好適な有機ポリマーがこの分野で知られている。ここに記載されている樹脂において用いるために好適な固体支持マトリックスには、例えば、セルロース、再生セルロース、アガロース、シリカ、被膜シリカ、デキストラン、ポリマー（例えばポリアクリル酸、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、Fractogel、EnzacrylおよびAzilactone等の市販のポリマーを含むポリメタクリルアミド）、コポリマー（スチレンおよびジビニルベンゼンのコポリマー）、それらの混合物およびそれらに類するものが含まれる。また、少なくとも1つのモノマーが、結果として生じるポリマー中において反応性官能基を含むかまたは含むよう派生させることが可能な場合には、二元、三元、および高度ポリマ

一を用いることができる。付加的な実施例においては、固体支持マトリックスは、その骨格中に取り込まれたイオン性官能基を含んでいてもよい。例えば、好適なマトリックスには、良く知られているポリエチレンアミン並びに二級または三級アミンを用いているその他のマトリックスが含まれる。しかしながら、好ましくは、固体支持マトリックスは如何なるイオン性官能基をも含まない。

リガンドの共有結合での取り付けを可能としている、固体支持マトリックスの反応性官能基はこの分野で良く知られている。このような原子団には、ヒドロキ

シル（ $\text{Si}-\text{OH}$ 等）、カルボキシル、チオール、アミノおよびその様なものが含まれる。従来の化学反応により、これらの官能基を、それ自体にリガンドを共有結合で取り付けるために用いることが可能である。付加的には、従来の化学反応により、このような原子団を固体支持マトリックスに取り込ませることが出来る。例えば、カルボキシル基はアクリル酸またはそのエステルを重合過程において用いることにより直接取り込ませることが出来る。重合において、アクリル酸が用いられればカルボキシル基が存在し、アクリル酸が用いられればカルボキシル基を含むようポリマーを派生させることが出来る。

「イオン性リガンド」という用語は、1つのイオン性官能基とリガンドを固体支持マトリックスに共有結合で取り付けるための1つのスペーサーアームとから成り、そこにおいてイオン性官能基が、あるpHでは静電的に荷電し別のpHにおいては静電的に荷電していなくなることが可能な1以上の原子団を含んでいるものから成る原子団を指す。好ましいイオン性官能基には、例えば、アミン基、フェノール基、カルボキシル基、ヒスチジル基、ピリジル基、アニリノ基、モルフォリル基、イミダゾール基、およびそれに類するものが含まれる。イオン性リガンドが滴定しはじめるpHを改変する目的での、イオン性官能基またはスペーサーアーム上の置換体もまた含まれても良い。例えば、フェノール基上の1以上のニトロ基、ハロ基、アルキル基等は、この原子団が静電的に荷電するpHを変化させるであろう。このようなリガンドの改変は当業者のうちで良く知られている。

スペーサーアームとは、イオン性官能基を固体支持マトリックスに共有結合的

に取り付ける如何なる原子団または置換体をも指す。そのようなスペーサーアームはこの分野で良く知られており、例としてのみあげると、アルキレン基、芳香族基、アルキル芳香族基、アミド基、アミノ基、ウレア基、カルバメート基、R₁およびR₂が1つのアルキレン基（例えばC₁—C₆）でYが酸素または硫黄である—R₁—Y—R₂—基、およびそれらに類するものが含まれる。

「選択されたイオン性リガンド」とは、固体支持マトリックスへの共有結合での取り付けのために選択されたりガンドまたはリガンドの混合物を指す。イオン性リガンドの選択は、リガンドが疎水的性質を有するであろうpHおよびリガン

ドが親水的および／または静電氣的性質を有するであろうpH、並びにこれらのpHでの樹脂の安定性に関連して選択される。逆に、結合または放出のために選択されるpHは、標的化合物の物理的および化学的性質および標的化合物のこれらのpHにおける安定性によっている。

「標的化合物が樹脂に結合するpHにおいて部分的に静電氣的に荷電している」という用語は、5%より大きく100%未満までの樹脂上のイオン性官能基が、標的化合物の結合pHにおいて荷電していることを意味する。好ましくは5%より大きく約40%までの樹脂上のイオン性官能基がこのpHで荷電している。

「非イオン性リガンド」という用語は、固体支持マトリックスに直接的にまたはスペーサーアームを介して直接にではなく共有結合により取り付けられた原子団であって、容易にイオン性である官能基を含まないものを指す。好適な非イオン性リガンドには、例えば、アルキル基、芳香族基、（フェニル、ナフチル等）およびアルキル芳香族基（ベンジル基）等が含まれる。

「高イオン強度」という用語は、約24.3モリモー（ミリジーメンズ）以上の比導電率（伝導率）を提供するために要求されるイオン強度を意味する。例えば、このような導電率は、250ミリモル（mM）塩化ナトリウムを用いることにより到達できる。「低イオン強度」という用語は、約24.3ミリモー未満の比導電率を提供するために要求されるイオン強度を意味する。溶液の比導電率の決定のための手順は当業者に良く知られている。

方法

クロマトグラフィー用樹脂の標的化合物の精製における利用は、この分野で良く知られている。これらの樹脂は通常、リガンドがそこに直接またはスパーサーアームを介して結合されている粒状またはビーズ化固体支持マトリックスから成る。標的化合物を含む水性溶液は樹脂と接触される。例えば、化学的荷電、相対的疎水性、または特異的吸着に基づく樹脂と標的化合物との間の相互作用は、溶液中の標的化合物を樹脂へ結合させることを可能としている。樹脂と標的化合物との間の相互作用を相殺する放出バッファの条件を特異的に変更することにより、標的化合物を選択的に回収することが可能である。

ここに記載されている方法は、これまでの従来技術のクロマトグラフィー用回

収方法の改良を表すものであり、これらの方法は産業的な量での標的化合物の発酵液体培地等の水性培地からの回収のための高効率の手段を提供するものである。1つのとりわけ好ましい態様においては、ここに記載されている方法は、発酵液体培地からのタンパク質の回収（キモシンおよびスブチリシン等）の精製に極めて有用であるが、それは精製がしばしば粗液体培地から直接行われるからであり、さらに清澄化された粗液体培地の標的タンパク質以外の成分はこれらのマトリックスに結合しないであろうからでもある。

ここに記載されている方法は、非常に高い標的化合物純度が要求されていない、産業用酵素等に特に有用であるが、それはこの純度レベルが1段階の精製で達成され得るからである。必要に応じて、液体培地はpH調整の後に、もし必要であれば、希釈、濃縮、脱塩、塩添加または微粒子除去をすることなしに充填されてもよい。同様に、標的化合物の樹脂からの放出は、塩添加または脱塩の必要無しに、単にpH調整によって実行可能である。ここに記載されている樹脂は腐敗に感受性が低く、イオン性ではない樹脂と比較してより容易に再生可能であることは考慮されるべきである。

ここに記載されている樹脂はいくつかの重要な特徴の組合せを提供する。これらは、標的化合物の粗水性溶液からの直接的回収を可能とし、下流の工程の開始時での顕著な精製を可能とするであろう。低イオン強度バッファ中への放出は、クロマトグラフ工程におけるそれに続く段階、即ちイオン交換または吸着クロ

マトグラフィーの前に好適なものである。それらはまた、迅速で安価な過酷ではない条件下での溶出を可能とする。最小の段階またはグラジエント技術が必要であるが、他の塩は少量必要とされるかまたは必要なく、溶媒は少量必要とされるかまたは必要ない。

本発明の方法における結合の一般的本質により、これらの方法は他のクロマトグラフ的手順と比較して低い特異性を示すかもしれない。例えば、発酵液体培地処理の場合には、液体培地は、異なった疎水性を有する異なった主要タンパク質混在物を有しているかもしれない[19]。故に、顕著なレベルでの非標的タンパク質の結合も生じうる。

ここに記載された方法を用いた精製または分画は、標的化合物の疎水性および

／または等電点（ pI —もし適切なら）がほとんどの混在物と異なっていることを必要とする。非標的化合物と類似した疎水性および等電点を有する標的化合物は、グラジエント放出なしでは共に溶出されることもある。このことは試料の前処理またはリガンド、スパーサーアームおよびマトリックスの変化により、ここに詳細に記載されているように相殺することが可能である。付加的には、ここに記載されている方法においては、化合物の結合が高および低イオン強度の両方で実現可能であるため、樹脂に接触している溶液のイオン強度を変化させることにより、樹脂に結合された標的化合物を保持した一方で、いくつかの不純物を除去しうる。また、低イオン強度での pH の変化が、1つの標的化合物を他から選択的に放出するために有効であり得る。他方で、いくつかの工程、例えば、ホエータンパク質回収等においては、定量的な化合物の結合および回収が好ましい。ここに記載されている方法はまた、非共有結合的酵素固定化[14-18]のためにも有用であるが、それは結合が強固で酵素の回収が簡単であるからである。

以下に記載されている方法は、標的化合物の結合のために有用な特定の樹脂を用いている。これらの樹脂への結合は、樹脂が疎水性の特性を有する pH においてなされ、従って、結合は原理的には疎水性相互作用により成されるが、これはこの pH で樹脂上のイオン性リガンドが部分的に荷電しているという事実と対立するものではない。樹脂と標的化合物の結合 pH における疎水性相互作用の度合

は、標的化合物の樹脂への結合の強度が制御可能であるように、合理的に選択される。そのような選択は、適当なマトリックスおよびリガンドであって、そこで用いられているスペーサーアームを含めて、これらの材料の組合せが樹脂の制御された疎水性を提供しているものを利用することにより成されている。

さらに疎水性を制御するための1つの手段は、固体支持マトリックス上の非イオン性リガンドの集団で、高度に疎水性（フェニルまたはベンジル基を含む等）またはより親水性（アミド、ウレタンまたは非イオン性ヒドロキシル基を含む等）の何れかであるものを含むものである。そのような要素は、ここでの教示に基づいたこの分野の技術の範囲内にある。好ましくは、非イオン性リガンドが用いられたとき、固体支持マトリックス上の非イオン性リガンドの密度は、イオン性で非イオン性のリガンドの総数に基づいて0から80パーセントの範囲になるであ

ろう。

さらに、リガンドがチオエーテル結合を介して固体支持マトリックスに取り付けられている場合、樹脂の疎水性は、いくつかのまたは全ての樹脂中の硫黄原子をスルホキシドおよび／またはスルホン基に酸化することにより制御されてもよい。樹脂中に存在するスルホキシドおよび／またはスルホン基の密度を増加させることにより、樹脂の疎水性は減少する。チオエーテル基をスルホキシドまたはスルホン基に酸化するために好ましい手順はこの分野で良く知られている。

ここに記載されている方法は、組換え産物を含むタンパク質またはペプチドを含む幅広い範囲の標的化合物を回収するために有用である。この方法はまた、植物および動物給源等の天然給源からの抽出物において、化合物の分離を行うために用いることが出来る。

ここに記載されている樹脂は、固体支持マトリックスに取り付けられたイオン性および必要に応じて非イオン性リガンドを用いている。リガンドの共有結合的取り付けの何れの方法も、取り付けにより所望のイオン性基以外のイオン性基の導入という結果にならない限り、用いることが出来る。そのようなリガンドの固体支持マトリックスへの取り付けのための方法の例としては、共有チオエーテル

、エーテル、アミド、アミン、ウレタン結合が含まれる。他のチオエーテル法、ジスルフィド取り付けおよびウレア法もまた用いられてもよい。付加的には、ヒドラジンリガンドがエポキシド基またはアルデヒド官能基に取り付けられてもよい。アルデヒドを介した取り付けの場合は、続いてイミンの還元（シアノボロヒドリドによる等）が好ましい。

代表的なリガンド取り付け化学反応が表 1 に示されている。ほかのリガンド取り付け化学反応がこの外でも示され、および／またはこの分野で知られている。

表 1
リガンド取り付け化学反応

マトリックス官能基	活性化化学物質	リガンド	
		反応性基	結合
ヒドロキシル	カルボニルジイミダゾール	アミン	ウレタン
		アミン	アミン
	エポキシド	チオール	チオエーテル
		ヒドロキシル	エーテル
		アミン	多様
	CNBr	アミン	アミン
	塩化トシル	チオール	チオエーテル
	ジビニルスルホン	アミン	アミン
		チオール	チオエーテル
		ヒドロキシル	エーテル
カルボキシル	カルボジイミド	アミン	アミド
アミン	カルボジイミド	カルボキシル	アミド
アミン	ヒドラジン/HNO ₂	アミン	アミド

これらの各々の化学反応はこの分野で良く知られており、カップリングは上記の連結という結果となる。例えば、リガンドは、カルボニルジイミダゾール（CDI）試薬を図 1 および 3 に示されているように用いた中性ウレア結合を介して、活性化セルロースマトリックス等の固体支持マトリックスに取り付けられてもよい。他には、リガンドは、図 4、実施例 1 および 3 に示されているようにアミノカプロン酸スペーサーアームで派生されたセルロースマトリックスにアミド結合を介して取り付けられてもよい。必要であれば、スペーサーアームのカルボキシル基の 100%置換を成すことも可能である。このような置換はこの分野で良く知られた小イオン滴定等の手順で確認することが可能である。

カルボニルジイミダゾール (CDI) 活性化マトリックスを介したリガンドの取り付けは、図1に示されている。リガンドのマトリックスのカルボキシル基へのカルボジイミドカップリングは図2に示されている。CDI-カプロン酸支持体は図3に示されている。起こりうるCDI-カプロン酸マトリックスの派生は図4に示されている。

リガンド取り付けのための、CDI 活性化マトリックスとは別の選択としては、その調製方法およびそれへのリガンド取り付けが図5および6に例示されている、エポキシド基を含んだ樹脂がある。特に、図5は、チオール含有リガンドのエポキシド活性化固体支持マトリックスへの取り付けを示している。この樹脂においては、リガンドは安定な中性チオエーテル結合を介して取り付けられている[10]。この化学反応を用いることが出来るリガンドには、例えば、メルカプトベンズイミダゾール、4-メルカプトピリジン、2-メルカプトピリジン、メチマゾールおよび4-ヒドロキシチオフェノールが含まれる。図6は、アミンとエポキシド活性化固体支持マトリックスとの反応を示している。両方の場合に用いられた化学反応は典型的には水性で、それ故にCDI法と比較してより安価となっている。しかしながら、この化学反応は、マトリックス中に、充填容量を減少させ得る架橋結合を導入する。図6に示されているように、イオン性アミン官能基は、結果として生じるリガンドにおいて保持され、従って、この図においてアミンに取り付けられた原子団はさらにイオン性(ピリジン、 $-CH_2-$ ピリジン等)または非イオン性(アルキル等)官能基を含みうる。

その他の、チオールリガンドでのマトリックス改変のために好ましい活性化剤は、1つの高度に反応性である原子団および反応性の原子団へと派生可能な1つの原子団を有する。その高度に反応性である原子団は、マトリックスのヒドロキシル基とアルカリ性のpHで反応し、安定した結合を形成するが、第2の原子団はこのような条件下では反応しない。このことにより、架橋を防止している。第1の活性化段階ののち、第2の原子団は、直接反応させることが可能な反応性の原子団へと派生される。アリルハライド(アリルブロミド等)およびアリルグリシジルエーテルが好ましい試薬である。他の試薬には、例えば、2および4-ビ

ニルピリジン、2-および4-メルカプトエチルピリジン、およびアミノピリジンが含まれる。例えば、アリルグリシジルエーテルで活性化された固体支持マトリックスは、エピクロロヒドリンで活性化されたものよりも高い置換レベルを可能とする。これらのリガンドの樹脂への共有結合的取り付けにおいて、アリル基は、イオン性官能基（臭素水の反応でブromo派生体を形成し、続いて4-ヒドロキシ安息香酸のビスナトリウム塩と反応する等）を取り込むように改変され得る。

イオン性官能基は、固体支持マトリックス中に取り込まれていても良いことが理解される。例えば、ポリアミンまたはアミン官能基を含むポリマーを、アミン官能基が低pHでイオン性である場合は用いることができる。このような実施例においては、ポリマーは他の官能基を含むように調製されてもよく、リガンド取り付けはアミン基またはそのような他の官能基の何れかを介して成されてもよい。前者の実施例においては、リガンド取り付け化学反応はマトリックスの骨格のイオン性官能基の少なくとも一部を保持するために用いられている。

ここに記載されている樹脂上で有用なイオン性リガンドには、固体支持マトリックスに共有結合している3-（アミノメチル）ピリジン（3AMP）、4-（アミノメチル）ピリジン（4AMP）、1-（3-アミノプロピル）イミダゾール（API）、2-（アミノメチル）ベンズイミダゾール（AMB）、4-（3-アミノプロピル）モルフォリン（APM）、ヒスタミンおよびその様なものによって、上記の表1および以下の実施例に記載されている化学反応を用いて派生されたものが含まれる。本発明の樹脂を形成するための他の好適な化合物は、4-（アミノメチル）ピリジン、2-（アミノメチル）ピリジン、フロロ、クロロ、ブromoおよびヨードからなる群より選択された1から2のハロ基を有するハロトリアミン、4-アミノ酪酸、（1S、2S）-（+）-2-アミノ-1-フェニル-1,3-プロパンジオール、（-）-フェニルプロパノールアミン、フェニルエチルアミン、フェニルアラニンオール、4-（2-アミノエチル）ベンゼンスルホンアミド、DL-β-ヒドロキシフェニルエチルアミン、チオサリチル酸、2-メルカプト-1-メチルイミダゾール、2-メルカプトベンズイミダゾール

ル、4-メルカプトエチルピリジン、2-メルカプトエチルピリジン、4-メルカプト酪酸、5-メルカプトバレリアン酸、6-メルカプトヘキサノン酸、4-ヒドロキシチオフェノール、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロヒドロキシフェニル酢酸、3、5-ジクロロサリチル酸、4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸、3-ニトロチロシン、およびフロロ、クロロ、ブロモ、ヨードから成る群より選択された1から2のハロ基を有するハロチロシン、ヒスチジン、アニリンおよびパラ-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジンが含まれる。

疎水性アミン化合物がイオン性または非イオン性リガンドを生成させるために用いられた場合、それは2-フェニルエチルアミン、L-フェニルアラニンオール、(1R, 2S) - (-) - フェニルプロパノールアミン、トリプタミン、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホンアミド、(1S, 2S) - (+) - 2-アミノフェニルプロパンジオールおよび1-ヘキシルアミンから成る群より選択されるのが好ましい。イオン性リガンドが生成される場合、アミノ基はこれらの分子中で、例えばエポキシドとの反応で保持されており、アミンは連結アームの一部を形成する。非イオン性リガンドが生成される場合は、アミン基は比較的、例えば、カルボキシル酸とのアミド形成のための反応により、分子から除去されている。

他の有用なリガンドには、置換されていないフェノールおよび置換されたフェノールを6-9のpKa範囲で含有するものが含まれる。好適なフェニル基の置換基には、ニトロ、ハロ（クロロ、ブロモ等）、1-10の炭素原子を有するアルキル、1-10の炭素原子を有するアルコキシ、エステル基が1-10の炭素原子を有するカルボキシルエステル、シアノ、1-10の炭素原子を有するカルボニルアルキル(-C(O)R)基、およびそれらの混合物が含まれる。典型的には、置換フェニル基は1から4のこのような置換基を有しており、好ましくは1から2である。上記の置換基は、ピリジル基、ヒスチジル基、インドリル基、イミダゾリル基、モルフォリニル基、ベンズイミダゾール基、およびその様なものを有するリガンドを含む、他の置換リガンドにも取り付けられることが可能で

ある。

ここに示されたイオン性リガンドのリストも、これらのリガンドの固体支持マトリックスへの共有結合的取り付けに用いられた化学反応も、包括的に意図されたものではない。好適なりガンドの固体支持マトリックスへの取り付けはこの分野で良く知られている化学反応を用いると知れば十分である。

イオン性リガンドは、好ましくは、樹脂上に、標的タンパク質が高および低イオン強度の両方で結合可能とするに十分な濃度で存在している。好ましくは、イオン性官能基は、樹脂上に、少なくとも樹脂の乾燥重量 1 g あたり約 1 m モルまたは少なくとも約 150 μ モル / ml 樹脂の何れか小さい値より多い濃度で存在

している。1つのとりわけ好ましい態様においては、非イオン性リガンドが、イオン性官能基と組み合わせて、標的化合物の樹脂への結合および樹脂からの放出の pH における疎水性／親水性の度合に關しての更なる制御を提供するために用いられている。この態様においては、非イオン性リガンドのリガンド総数に關連したパーセンテージは、約 0 から約 80 パーセント、好ましくは 0 から 40 パーセントの範囲にある。

本発明の方法においては、回収すべき標的化合物を含む溶液または水性培地は、ある pH においては高および低イオン強度で水性培地中の標的化合物の少なくとも 50 % が樹脂に結合するために十分であるようなその疎水的特性である樹脂と接触される。この pH においては、結合は主に疎水性相互作用によるものであり、樹脂の疎水性の度合はスペーサーアームおよび／またはリガンドを含むイオン性官能基の改変により、いくらか疎水性である固体支持マトリックスを用いることにより、非イオン性リガンドを用いることにより、リガンドの固体支持マトリックス上の密度を増加させることにより、またはこれらの組合せにより調整することができる。ここにおける教示の観点から、当業者は合理的にこれらの変数を標的化合物の性質を所望の促進との組合せに基づいて、調節することができる。

回収すべき標的化合物、例えばキモシン等のタンパク質、を含有する培地は、微生物のまたは動物給源を含む公知の何れの給源から由来してもよい。例えば、

キモシン溶液は、*Aspergillus*、*E. coli*、酵母からの発酵液体培地並びに牛の第四胃から得られた水性抽出物を含んでもよい。

水性培地はバッファーおよび／または塩を、樹脂への結合効率を高めるために含んでもよい。しかしながら、上述のとおり、標的化合物の結合は高および低いイオン強度でも達成され、従って、塩の水性培地への添加は単にさらなる結合をもたらすためにすぎない。好適な塩は従来クロマトグラフィーで用いられているもので、例えば、塩素、硫酸、リン酸、酢酸のリチウム、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、およびマグネシウム塩を含む。好ましくは塩化ナトリウムが用いられるが、それは効果的で安価で安全であるためである。

上記のように、ここに記載された樹脂は、水性培地由来の標的化合物に高および低イオン強度で結合する。特に、これらの樹脂は約50%またはそれ以上の水

性培地中の標的化合物を、高および低イオン強度で結合するであろう。勿論、用いられた樹脂の量が培地中のすべての標的タンパク質を結合するために十分な容量を有することは理解されている。

水性培地は樹脂と標的化合物が樹脂に結合することを可能とするために十分な時間にわたって接触される。この接触は、例えば、樹脂がカラムにつめられている、液状化されたベッドで用いられている、または樹脂が水性培地とともに混合されているところの攪拌バッチ系に懸濁されている等のようななされる。このような条件下では、標的化合物は樹脂に結合しそれにより樹脂-化合物複合体を形成する。水性培地を樹脂と接触させた後、樹脂は続いて、水性培地を樹脂およびそこに形成された複合体から分離するために、水性培地と同じpHを有するバッファーで洗浄される。バッファーは付加的に少なくとも2Mまでの上記の塩を含んでもよい。

標的化合物は続いて、樹脂の特性を疎水性特性から親水性および／または静電的特性に変化させるpHを有する水性培地と単に接触させることにより、樹脂から放出される。このことは、リガンド上のイオン性官能基がより荷電するかまたは標的化合物結合pHにおけるリガンドの極性とは異なった極性の電荷を帯びるようなpHを選択することによって成される。樹脂からの放出が、標的化合物

の放出 pH での結合特性を変えることによってもまた成されることは理解できる。

本発明の好ましい態様においては、放出 pH における樹脂上の電荷は、放出 pH における標的化合物の正味静電氣的電荷と同じ極性であり、それにより生じる樹脂と標的化合物との間の電荷—電荷反発は、何れの樹脂との疎水的相互作用をも克服し、それにより樹脂からの放出をなすために十分である。このことは、上記の樹脂の相対的疎水性を合理的に選択することにより、および／または、樹脂上の大量の静電氣的荷電を放出 pH において効果的に提供するために十分な量のイオン性リガンドを取り込むことにより成されうる。

別の本発明の態様において、誘導された樹脂上の電荷は標的化合物の放出 pH における正味静電氣的電荷と反対の極性である。この態様においては、標的化合物の樹脂からの放出は、例えば、高イオン強度の溶出液の使用によって成される。何れの態様においても、エチレンまたはプロピレングリコール等の極性減少剤に

より、樹脂からの標的化合物の放出をなすことができる。

リガンドの選択は標的化合物の pH の制限に基づいている。例えば、ある状況において、標的化合物が安定な pH において陽性に荷電するイオン性官能基を有する樹脂を、化合物の結合または放出のために極端な pH を避けるために用いることが好ましいこともある。同様に、標的化合物が安定な pH において陰性に荷電するイオン性官能基を有する樹脂が好ましい場合もある。ここでのリガンドとして有用なイオン性官能基を有する化合物には、例えば、カプロン酸、6-アミノカプロン酸、(pH 3.3 から滴定)が含まれる。チラミン等のフェノール性化合物もまたこの点で有用であるが、それはフェノールのヒドロキシル基が pH 6 およびそれ以上で滴定するからである。ニトロ化またはクロロ化フェノールまたはチラミンリガンドは、それらが中性 pH に近い pK_a 値を有しているために特に有用である。さらにその他の、ここでのリガンドとして有用であるイオン性官能基を有する化合物には、例えば 4-(アミノメチル)ピリジン、3-(アミノメチル)ピリジン、2-(アミノメチル)ピリジン、1-(3-アミノプロピ

ル) -イミダゾール、2-(アミノメチル)-ベンズイミダゾール、4-(3-アミノプロピル)モルフォリン、フロロ、クロロ、ブロモおよびヨードから成る群より選択された1から2のハロ基を有するハロトリアミン、4-アミノ酪酸、(1S、2S)-(+)-2-アミノ-1-フェニル-1,3-プロパンジオール、(-)-フェニルプロパノールアミン、フェニルエチルアミン、フェニルアラニンオール、4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホンアミド、DL-β-ヒドロキシフェニルエチルアミン、チオサリチル酸、2-メルカプト-1-メチルイミダゾール、2-メルカプトベンズイミダゾール、4-メルカプトエチルピリジン、2-メルカプトエチルピリジン、4-メルカプト酪酸、5-メルカプトバレリアン酸、6-メルカプトヘキサノン酸、4-ヒドロキシチオフェノール、4-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロヒドロキシフェニル酢酸、3、5-ジクロロサリチル酸、4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸、3-ニトロチロシン、ハロチロシン、ヒスチジン、およびパラ-ヒドロキシ安息香酸ヒドラジンが含まれる。

標的化合物(タンパク質等)が生理的pH(即ち5から9のpH)においての

み安定である別の態様においては、固体支持マトリックスに取り付けられたイオン性リガンドは、約5から9、より好ましくは約5.5から約8.5のpH範囲で完全にまたは部分的に滴定する樹脂を提供しなければならない。このような範囲は、標的タンパク質の結合および放出を、多くのタンパク質の場合に、より極限的であるpH範囲と比較して、変性等のリスクが減少されているpH範囲で可能とする。

ここに記載された方法においては、マトリックス上のリガンドの密度は標的化合物の結合が高および低イオン強度で成されるように選択される。湿ベースで、そのような結合をもたらすために必要であるリガンド密度は、好ましくは少なくとも樹脂1mlあたり約150μmol、そしてより好ましくは少なくとも樹脂1mlあたり約175μmol、さらにより好ましくは少なくとも樹脂1mlあたり約200μmolである。乾燥ベースでは、そのような結合をもたらすために必要であるリガンド密度は、好ましくは少なくとも樹脂の乾燥重量1gあたり約1m

モル、およびより好ましくは少なくとも樹脂の乾燥重量 1 g あたり約 1.33 mモルである。このことは、水性培地の処理を希釈、濃縮、脱塩、塩の添加または微粒子の除去を行うことなしに可能としている。ここに記載されている樹脂を用いることによって考えられる別の利点は、これらの樹脂が、液体培地からのタンパク質等の標的化合物の分離のために以前用いられていた樹脂よりも腐敗が少ないであろうことである。

標的化合物の樹脂からの上記の方法での分離において、回収された標的化合物溶液はさらに従来の方法で処理されてもよい。

この工程において用いられた樹脂は、従来の方法で再生されてもよい。例えば、陽性に荷電する官能基を有するリガンドを用いた樹脂は、0.1 M HCl を、エタノールやエチレングリコール等の極性減少剤と共に用いるかにまたは用いずに使用することにより再生され得るかもしれない。同様に、陰性に荷電する官能基を有するリガンドを用いた樹脂は、0.1 M NaOH を、再びエタノールやエチレングリコール等の極性減少剤と共に用いるかにまたは用いずに使用することにより再生され得るかもしれない。しかしながら、苛性アルカリへさらすことはCDIマトリックスの加水分解という結果となり、そしてマトリックス膨張を

引き起こしうる。活性化の前のセルロースマトリックスの架橋させることが、膨張を減少させカラム流量比を改善するために行われている。架橋は陽性にイオンか可能な樹脂に行っても良い。

腐敗が問題である場合、水性培地の、高イオン強度でDEAE等の安価な樹脂を通過する流れによる前処理は、分離を改善し得る。例えば、標的化合物がスブチリシンである場合、DEAEカラムでのスブチリシン試料の前処理を行うことにより、99%以上の酵素活性を保持しながら、腐敗の顕著な激減という結果となった。腐敗の激減は再生、樹脂の寿命、および容量を改善する。この余分な段階は、前処理カラムからの流れを、バッファー調節をすることなく直接的に、本発明の分離システムに充填できる場合に特に好ましい。

上記のように、選択された樹脂並びに処理条件（バッファー等）は、精製され

るべき標的化合物に関連している。例えば、タンパク質スブチリシンはpH 4.5以下では不安定であるので、そのpH以下のバッファーは用いることができない。さらに、スブチリシンを扱う場合は、 Ca^{2+} キレート化を避けるためにクエン酸バッファーは回避されるべきであるが、それは Ca^{2+} がこの酵素を安定化するからである。さらに付加的には、リン酸バッファーは Ca^{2+} を沈殿させることがあり、それゆえ、このようなバッファーもまた回避されるべきである。好ましいスブチリシンの作用範囲はpH 5-7である。pH 7-10の範囲での操作は限定された期間でのみ許容できる。また、スブチリシン回収方法に関して、100-200mMのモル濃度のバッファーが、放出のために必要である初期pH調整には好適である。一旦pHが調整されると、バッファーのモル濃度は希釈により減少させることができる。酢酸バッファー(pH 5.2)は、ほとんどの疎水性で陽性にイオン性なマトリックスに対して十分な回収を提供する。8%ギ酸、40%プロピレングリコール、pH 5.5を含むグリコールバッファーは、試験したこのような全てのマトリックスからスブチリシンを溶出した。

ここに記載された樹脂は、簡便な結合および放出手順を用いた大規模な標的化合物回収のための特定の用途を有しているものであり、ここに記載された樹脂および方法は、FPLCまたはHPLC分析的または高価値調製の利用にも用いてもよい。特に、減少塩グラジエントが、樹脂が疎水的性質を有する場合および

(a) 親水性および／または静電氣的(イオンの)の型へのpHシフトとそれに続く増加塩グラジエントまたは(b)疎水性型のpHからはるかにシフトさせるpHグラジエント溶出の場合に用いられてもよい。

アフィニティーリガンドとイオン性リガンドの混合物を用いる場合は、アフィニティー結合の利点は静電氣的な反発による簡便な放出と組み合わせられてもよい。結合は滴定可能なリガンドが静電氣的に部分的にのみ荷電しているか不活性であるpHで行われるであろうし、放出はpH変化によるであろう。これはRuan n n' s法[20]およびTeichberg' s吸着反発[21]の共通点である。

さらに、本発明の樹脂およびシステムは、例えば、液体-液体抽出およびポリ

マー／UFシステム等の非クロマトグラフィー樹脂システムに応用され得る。液体－液体抽出のための〔22、23〕ポリエチレングリコール等の、改変された相分離ポリマー、改変された膜〔24〕または水溶性ポリマーUF法〔13、25〕もまた、本発明のシステムを用いることができる。このような態様においては、樹脂およびマトリックスは固体または非水溶性である必要はない。

実施例

以下の実施例は本発明の特定の態様を示すために提示されており、本発明の範囲の限定として解釈されてはならない。

実施例1から6は、活性化樹脂の調整のための方法および／またはそれに続く代表的なリガンドの取り付けを示している。これらの実施例は、1994年6月29日に、代理人事件番号第010055-126号として出願された米国特許出願第08/268178号に記載されており、その出願はここにその全体が参考文献として取り込まれている。

これらの実施例において、用いられた略語は以下の意味を有している。定義されていない場合は、以下に用いられている略語は一般に受け入れられている意味を有する。

AES = p - (2アミノエチル) ベンゼンスルホンアミド；

API = AP Imidazole = APIMID = 1 - (3 - アミノプロピル)

イミダゾール；

AMB = AM Benzimidazole = 2 - (アミノメチル) ベンズイミダゾール；

APM = AP Morpholine = 1 - (3 - アミノプロピル) モルフォリン；

2AMP = 2 AMPyridine = 2 - (アミノメチル) ピリジン

3AMP = 3 AMPyridine = 3 - (アミノメチル) ピリジン

4AMP = 4 AMPyridine = 4 - (アミノメチル) ピリジン

APP = (1S, 2S) - (+) - 2 - アミノフェニルプロパンジオール；

CDI = カルボニルジイミダゾール；

DAH=ジアミノヘキサン；

DEAPA=3-ジエチルアミノプロピルアミン；

DMSO=ジメチルスルホキシド；

ECH=エピクロロヒドリン；

EDC=(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド；

EEDQ=N-エトキシカルボニル-2-エトキシジヒドロキノリン；

g=グラム；

HEX=ヘキシルアミン=1-ヘキシルアミン；

M=モル；

mg=ミリグラム；

MG1=1-(3-アミノプロピル)イミダゾール-置換Perloza樹脂；

MG2=4-(アミノメチル)ピリジン-置換Perloza樹脂；

MG3=Perzola MT 100 Fine上の架橋されていない樹脂（直径：80-100ミクロン；リガンド密度：207 μ モルカプロン酸/mL）

；

MG3a=Perzola MT 100 Fine上で1%エピクロロヒドリン（リガンド密度：225 μ モル/mL）と架橋された樹脂；

MG3b=Perzola MT 100 Medium Perzola（直径：100-250ミクロン；リガンド密度：216 μ モル/mL）上の樹脂；

mL=ミリリットル；

mM=ミリモル；

mmho=ミリモ-（1mS--ミリシーメンス）；

mmol=ミリモル；

MB=メルカプトベンズイミダゾール；

メチマゾール=2-メルカプト-1-メチルイミダゾール；

MP=4MP=4-メルカプトピリジン；

P=Perloza；

PALOL=フェニルアラニンオール；

PCC=Perloza CDI アミノカプロン酸樹脂；

PCDI=CDI 活性化Perloza；

PEA=フェニルエチルアミン；

PPA=フェニルプロパノールアミン；

psi=平方インチあたりのポンド；

rpm=分あたりの回転数；

S=セファロース；

TRPN=トリプタミン；

μ L=マイクロリットル；

上記の略語を用いて、下記の実施例で用いられた樹脂は一般に以下のように略される：[マトリックス]－[カップリング法]－[スペーサーアーム]／[イオン性官能基]。例えば、「P CDI 4AMPyrindine」とは、カルボニルジイミダゾール（CDI）で活性化され、4－アミノメチルピリジン基とカップリングされたPerloza固体支持マトリックス（P）を指し；「SECH メチマゾール」とは、エピクロロヒドリンで活性化され、2－メルカプト－1－メチルイミダゾール基（メチマゾール）とカップリングされたセファロース（S）固体支持マトリックスを指し、さらに、「P CDI DAH ヒドロキシフェニル酢酸」は、カルボニルジイミダゾール（CDI）で活性化され、ジアミノヘキサン（DAH）を介してヒドロキシフェニル酢酸とカップリングさ

れたPerloza固体支持マトリックスを指す。勿論、スペーサーアームとイオン性官能基がイオン性リガンドを含むことは理解される。

実施例 1

エポキシド活性化

前もって10倍の容積の水で洗浄されたセファロース6B（50g）を、47mLの1M NaOHおよび5mLのエピクロロヒドリンと、24時間にわたり4℃で混合した。エポキシド基置換はこの分野で知られている方法により1.06mモル/gと測定された。同様の活性化により、1.28および1.02mモル/gのエポキシド基置換を提供した。

実施例 2

エポキシド化セファロースへのアミンリガンドの取り付け

実施例 1 に記載されているように調製されたエポキシド化セファロース（10 g、1.06 mモル／乾燥 g）を、5 モル過剰（即ち 5 モルのリガンド／樹脂反応性基モル）の、AEB S、APP、TRPN から選択され、4 mL の DMSO および 2 mL の水に溶解されたリガンドと、24 時間にわたって 37℃ で混合した。5 モル過剰の HEX を同様に 10 g のエポキシド化セファロース（1.28 mモル）と混合した。その結果生成した樹脂を 10 倍の容積の 50% DMSO（DMSO：水、1：1）（トリプタミン樹脂のみ）、10 倍の容積の水、2 倍の容積の 0.1 M HCl およびさらに 10 倍の容積の水で洗浄した。リガンド置換は 0.1 M HCl での pH 4 までの滴定により、APP は 0.81 mモル／g、HEX セファロースは 0.99 mモル／g と決定された。このことは、約 80% のエポキシド基のリガンド置換効率を示している。以下の実施例 3 および 7 に示されている手順によれば、改善されたリガンド密度が達成される。

実施例 3

アリルグリシジルエーテル活性化

Perloza セルロース（Perloza MT 100 fine ビーズ化セルロース、Secheza、Czechoslovakia から入手可能）を 5 倍の容積の水（ミリQ グレードの水）および 3 倍の容積の 0.3 M NaO

H で洗浄し、吸引乾燥した。40 g の量のマトリックスを、12 mL の 99+% アリルグリシジルエーテルと、激しく振とうすることにより混合した。混合物を室温で 48 時間、時々振とうしながら放置した。活性化マトリックスを 10 倍の容積の水で洗浄し、3 倍の容積の水に懸濁した。臭素水（1%）を 5 分間にわたって混合物が臭素水をそれ以上脱色しなくなるまでゆっくりと添加した。臭素化された樹脂は 10 倍の容積の水で洗浄した。樹脂上のアリル基濃度は脱色された臭素水の量により決定した。樹脂上の反応性臭素基は（9 mL の水に懸濁された 1 g の試料）は、0.5 g の亜硫酸ナトリウム（4 時間、60℃）での置換およ

びそれに続く0.1M NaOHでのpH8までの滴定により決定した。

アリルブロミド活性化

Perlozaセルロース(MT 100 fine)を5倍の容積の水(ミリQグレード)で洗浄し、吸引乾燥した。10g量のマトリックスを、0.8mLアリルブロミド(再蒸留された)、0.8g水酸化バリウム8水和物、2mL

DMSOおよび1mLの水と、室温で48時間混合した。活性化されたマトリックスは5倍の容積の10%DMSO/90%水混合物、5倍の容積の0.1M

HClおよび10倍の容積の水で洗浄した。アリル基の濃度は上記の臭素水の方法で決定した。1gの活性化樹脂を3mLの水および100μLの3-メルカプトプロピオン酸と60℃で4時間にわたって混合することにより、独立したアリル基の測定を行った。この派生された樹脂は、20倍の容積の水、20倍の容積の0.1M NaOH、50倍の容積の水、20倍の容積の0.1M HClおよび100倍の容積の水で洗浄し、0.1M NaOHで滴定した。この滴定方法は、上記の活性化マトリックスに対しても応用可能である。

実施例 4

チオールリガンドの取り付け

上記の実施例1または3に記載されているように調製した樹脂(5g)を、5mLの1Mリン酸バッファー(pH7)に懸濁し、窒素を流した。5モル過剰のリガンド(4MP、メチマゾール、またはMB(5mLのDMSOに溶解)、またはチオサリチル酸)および0.1gナトリウムボロヒドリドを添加し、混合物を6時間反応させた。実施例1の方法で調製された樹脂を、室温で保持した。実

施例3または4の方法で調製された樹脂を60℃で保持した。その結果生成されたチオエーテル樹脂を5倍の容積の0.1M HCl、10倍の容積の水、5倍の容積の0.1M NaOHおよび20倍の容積の水で洗浄した。試料(1g)を0.1M HClによりpH3.5-2.7(MBリガンドの最低pH)まで滴定した。チオサリチル酸樹脂はNaOH、水、HCl、および水で洗浄し、0.1M NaOHでpH8まで滴定した。

実施例 5

ヒドロキシル（フェノール）リガンドの取り付け

上記の実施例3に記載されているように調製した樹脂（5 g）を、10モル過剰のヒドロキシルフェニル酢酸（2 mLの水およびpHを11.5に調整するために十分な1 M NaOH中に溶解して調製）と混合した。混合物は室温で24時間反応させた。樹脂は5倍の容積の0.1 M NaOH、10倍の容積の水、5倍の容積の0.1 M HClおよび20倍の容積の水で洗浄した。試料（1 g）を0.1 M NaOHでpH8まで滴定した。

4-ヒドロキシ安息香酸もまた、pHをpH11に調整した点を除いては同様の方法で用いることができた。この化合物並びにチオサリチル酸は、スブチリシン回収に好適なりガンドの調製に有用である。

実施例6

CDI活性化およびリガンド／スペーサーアームの取り付け

セファロースCL6BおよびPerlozaセルロースをCDIで活性化し、この分野で公知の方法で滴定した。セファロース1 gあたり30から80 mgのCDI、およびセルロース1 gあたり30から120 mgのCDIを用いて、1.0から3.5 mモル／gの活性化レベルが得られた。

ジオキサン可溶アミン試薬（API、APM、ヒスタミン、AMB、4 AMP、3 AMP、2 AMP、DAH、チラミン（水に溶かし、1 M NaOHでpHを12にし、凍結乾燥することにより塩酸塩から調製）およびジブロモチラミン（チラミン塩酸塩からこの分野で公知の方法により調製））を、直接、10 gのジオキサン溶解CDI活性化マトリックス（1 mLの水をチラミンリガンドに含有させた）の試料と反応させた。5モル過剰のアミン試薬をDAHを除いて用い、

DAHには10モル過剰で用いた。ジオキサン（5 mL）を添加し、樹脂を24時間室温で混合した。樹脂は3倍の容積の75%ジオキサン、2倍の容積の33%ジオキサン、10倍の容積の水、2倍の容積の0.1 M HClおよびさらに10倍の容積の水で洗浄した。

アミノカプロン酸およびニトロチロシン（ナトリウム塩型）はジオキサンに可

溶ではない。故に、アミノカプロン酸ナトリウムの40%溶液を、64 mLの10 M NaOH中の80 gのアミノカプロン酸を、最終容量200 mLとなるまでの水に溶解させて調製した。ジオキサン溶解活性化セルロース（300 g 樹脂+150 mL ジオキサン）およびセファロース（100 g 樹脂+50 mL ジオキサン）を、それぞれ80 mLおよび30 mLのアミノカプロン酸ナトリウムの溶液と、室温で24時間混合した。アミノカプロン酸樹脂は、2倍の容積の66%ジオキサン、2倍の容積の33%ジオキサンおよび20倍の容積の水により洗浄した。同様に、ニトロチロシンを水および3 M NaOHに溶解し、pH 11.3の15%溶液を生成した。50%ジオキサンに溶解させた活性化セルロース（10 g）を13 mLのニトロチロシン溶液に24時間、室温で混合させた。

実施例 7

アミド結合によるリガンドの取り付け（縮合反応）

（a）アミンリガンドの樹脂のカルボキシル基への100%カップリング：

5モル過剰のリガンド（4-AMP、3-AMP）ジメチルアミノプロピルアミンまたはAPI）を6 M HClによりpH 4.7に調整し、アミノカプロン酸樹脂（1.55 mmol/g）と混合した。pHは1 M HClまたはNaOHを適宜用いて4.7に調整し、3 M過剰の水溶性カルボジイミド（EDC、50%水溶液）を混合した。pHは1 M HClまたはNaOHを適宜用いて1時間にわたって4.7に保持し、さらに調整することなしに10時間室温で混合した。さらに1モル過剰のEDCを以前と同様の方法（1+10時間）で加えた。樹脂を10倍の容積の水、2倍の容積の0.1 M HClおよび10倍の容積の水で洗浄した。エタノールアミンをニトロチロシンセルロースに同様の方法でカップリングさせた。20 μ mol/gが検出可能な滴定によっては、これらの樹脂上に残存カルボキシル基は検出されなかった。

（b）アミノリガンドの、樹脂のカルボキシル基への部分的（50-80%）カップリング：

1. 5モル過剰の、APP、PPA、PEAまたはPALOLから選択されたリガンドを、pHを6 M HClによりpH 4.7に調整し、アミノカプロン酸

樹脂と混合した。pHは1M HClまたはNaOHを適宜用いて4.7に保持し、1.5M過剰のEDCを添加した。前述のとおり、pHは1M HClまたはNaOHを適宜用いて1時間にわたって4.7に保持し、さらに続いてpH調整することなしに10時間混合した。樹脂は前述のとおり洗浄し、残存カルボキシル基の量を滴定によって決定した。

(c) カルボキシルリガンドのジアミノヘキサン樹脂(1.24mmol/g)への100%カップリング:

この方法は前出の(a)と同様であるがリガンド(4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル酢酸または3-ニトロ-4-ヒドロキシ安息香酸)のpHは1M NaOHにより調整した。pHは5に維持され、ジアミノヘキサセルロースを用いて0.1M NaOH洗浄はHCl洗浄に置き換えた。ジクロロサリチル酸のために、ナトリウム塩を、水中の酸(0.3g)の懸濁液に1M NaOHをpHが安定的に7になるまで加え、凍結乾燥して調製した。この塩を10mLのDMSOに溶解させ、エトキシカルボニルエトキシジヒドロキノリン(EEDQ)(5mLのエタノールに溶解した0.5g)および50%DMSOに溶解したジアミノヘキサセルロースと混合した。この混合物は6時間にわたって温度で混合した。さらに0.5gのEEDQを導入し、反応は18時間続いた。この樹脂は5倍の容積のDMSO、2倍の容積の50%DMSO、10倍の容積の0.1M NaOHおよび10倍の容積の水で洗浄した。樹脂のアミノ基のこれらの方法によるカップリングは80から90%のみが完遂された。残存アミノ基はこの分野で知られている、アセチル化等の方法でブロックした。

実施例8

キモシン精製のための方法

実施例2、3(4MPを使用)および6(2AMP)3AMPおよび4AMP

(を使用)に記載されたように生成された樹脂を、使い捨てのカラムに詰め、充填バッファー(pH5.5:10mMクエン酸±0.5M NaCl)で平衡化した。キモシン試料を同じpHおよびイオン強度に調整し、カラムに接触させた。

非結合混在物を、この実施例で列挙されている両方のイオン強度の充填バッファで、バッファAおよびB（おのおの30カラム容量）を用いて洗浄した。この樹脂は、HClでpH2に調整した50mM KClによって溶出させた。キモシン活性は、200 μ lの試料を5mlの新鮮な全乳を37℃で1時間まで保温することにより定性的にアッセイした。活性は溶出画分にのみ検出された。

実施例6（PCC）および実施例7bに記載されたように調製された樹脂を上記のようにカラムに詰め、充填バッファB（pH4.4および10mMクエン酸±0.5M NaCl）で平衡化した。キモシン試料をこれらの充填条件に調整し、カラムに接触させた。前述のように、混在物は充填バッファBで洗浄した。樹脂は20mMクエン酸、pH6.2で溶出した。キモシン活性は溶出画分にのみ検出された。

この実施例に結果とは対照的に、同様のマトリックスから調製され、DEAP AおよびAPIMIDを用いた樹脂は高イオン強度においてはキモシンを結合しなかったが、これは疎水性／親水性および電荷のバランスが不適切であるためである。これらの結果は、イオン性官能基、スペーサーアーム、および固体支持マトリックスの適切な選択が、あるpHでの結合および別のpHでの放出をもたらすために必要であることを明確に示している。

実施例9

キモシンに対する樹脂容量

精製された組換えキモシンを用いて、バッチ操作により容量試験を行った。キモシンを使用前に透析、凍結乾燥した。用いた充填バッファは、0.5M NaClを含有する実施例8に記載されたものである。樹脂は充填バッファで（5容量）で平衡化し、吸引乾燥した。この樹脂の1つの試料（2-4g）を、10mLの計量シリンダー中で重さを計り、充填バッファ中に懸濁させ、48時間静置して落ち着かせた（樹脂の重量：容量比を決定するため）。別の樹脂の試料（0.1-0.15g）を25mLのバイアル中で重さを計り、10mLの

充填バッファに溶解された25mgのキモシンと、1時間にわたって4℃で回転ホイール上で混合させた。バイアルの中身は定量的にPierce使い捨て2

mLミニカラムに移し、10mLの充填バッファーで洗浄した。樹脂を適当なバッファーで（実施例8に記載されているように）、10mL容量測定用フラスコ中に溶出した。溶出物は280nmの紫外線吸収およびタンパク質アッセイ（ビシンコニン酸；b i c i n c h o n i n i c a c i dアッセイ）により分析した。容量データはmgタンパク質／樹脂mLによって、以下の表2に示されている：

表 2

樹脂	容量 (mgタンパク質／ml樹脂)
S ECH AMP	31
S ECH HEX	22
P CDI アミノカブロン酸 (100%置換)	68
P CDI カブロン酸-APP (67%置換)	71
P CDI カブロン酸-PPA (59%置換)	68
P CDI カブロン酸-PALOL (78%置換)	80

%置換とは、所定のイオン性官能基で置換されたカブロン酸またはアミノカブロン酸カルボキシル基のパーセントを指す。

実施例 10

疎水性陽性イオン性樹脂の滴定

滴定されるべき樹脂の試料（1g；湿重量）を0.1M NaOHで洗浄し、続いて水で濯いだ。試料を続いて9mLの500mM NaCl溶液（または表3で示されたように）に懸濁させ、0.1N HClで滴定した。滴定の数値は希釈効果に関して、派生されていないP e r l o z a対照について得られた滴定

値を差し引くことにより訂正した。滴定のデータは表3に示されている。

表 3
滴定データ

樹脂	樹脂の pKa	非荷電型で 滴定が開始するpH	90%荷電するpH
PCC DEAPA	9.3	10.5	8.4
P CDI APMorpholine	7.1	8.9	6.2
PCC APIImidazole	6.25	8.0	4.8
P CDI AMBenzimidazole	4.8	6.75	4.0
P CDI 2AMPyridine	4.1	6.1	3.0
P CDI 4AMPyridine	4.7	7.2	3.7
PCC 3AMPyridine	4.2	7.0	3.3
PCC API(10 mM NaCl)	5.0	8.0	3.6
P CDI APM(10 mM NaCl)	5.8	8.05	4.8
P CDI AMB(10 mM NaCl)	3.6	6.45	3.0*
S ECH Methimazole	5.6	7.6	4.5
S ECH 4 Mercaptopyridine	5.35	7.6	4.2
S ECH Mercaptobenzimidazole	4.2	6.5-7.0	3.1

* 低いpH値においては、酸希釈による、より大きな誤差が生じやすい。

実施例 1 1

疎水性陰性イオン性樹脂の滴定

0. 5 M NaCl 中の樹脂の試料 (1 g) を、1 M NaOHにより pH 12 に調整し、続いて 0. 1 M HCl によって pH 3 まで滴定した。滴定の数値は、希釈効果に関して、派生されていない Perloza 対照について得られた滴定値を差し引くことにより訂正した。滴定のデータは表 4 に示されている。

表 4
滴定データ

樹脂	樹脂の pKa	非荷電型で 滴定が 開始するpH	90%荷電する
P CDI DAH Nitrohydroxyphenylacetic Acid	6.4	4	7.5
P CDI Nitrotyrosine/ethanolamine	7.2	5	9.0
P CDI DAH Dichlorosalicylic Acid	7.2	5	9.3
P CDI Dibromotyramine	7.7	5	9.3
P CDI DAH Chlorohydroxyphenylacetic Acid	9.8	6.5	10.8
P CDI DAH Hydroxyphenylacetic Acid	10.7	7.5	11.2
P CDI Tyramine	10.7	7.5	11.2
PCC	5.2	3.0	6.5
PCC(10 mM NaCl)	6.1	3.3	7.5

表3および4のデータは、イオン性官能基を有する代表的な樹脂が静電的に荷電していない状態から荷電している状態へ転換されるpH範囲を示している。このデータは、当業者であれば、異なったイオン化特性を有する様々な樹脂を用意し、選択し、それにより回収されるべき標的化合物と両立しうる樹脂の使用を可能とし得ることを示している。

実施例12

アミノカプロン酸リガンドを有するCDI活性化Perlozaセルロースの、粗発酵液体培地からのスブチリシンに対するバッチ結合容量

PerlozaセルロースをCDIで活性化させ、アミノカプロン酸リガンドを、上記の実施例6の記載と同様の方法で取り付けた。3種類の樹脂の派生体は以下のように調製された。

MG3=Perzola MT 100 Fineの架橋されていない樹脂（直径：80-100ミクロン；リガンド密度：207 μ モルカプロン酸/mL）

MG3a=1%エピクロロヒドリンと架橋されたPerzola MT 100 Fine上の樹脂（リガンド密度：225 μ モル/mL）

MG3b=Perzola MT 100 Medium Perzola上の樹脂（直径：100-250ミクロン；リガンド密度：216 μ モル/mL）

容量試験は、同じのBacillus subtilis発酵液体培地を用い

てバッチ操作により行った。MG3樹脂を用いた容量試験では、1993年10月14日に出願され、ここに参考文献として取り込まれている米国特許出願番号第08/137,240号に記載されているBacillus subtilisの変異体を用いた。MG3aおよびMG3b樹脂をもちいた容量試験では、市販されているスブチリシン（PURAFFECT（登録商標）スブチリシン Genencor International, Inc., South San Francisco, California, USAより入手可能）を用いた。各々の場合において、スブチリシンは標的化合物であった。各々の場合において、液体培地は多様な、タンパク質を含む無関係の化合物を有していた。培地の伝導率は16mモ-であった。粗細胞分離は、培地を45,000rpmでSorv

a l l 冷却遠心分離機で20分間遠心分離することにより行い、上清のみを用いた。

4. 0 gの湿樹脂を、pH 5.2の50 mM酢酸ナトリウムバッファーで容量10 mlまで平衡化した。その結果落ち着いた樹脂の容量を、実験の開始に先立って記録した。

50 mLの液体培地を、氷酢酸によりpH 5.2に調整した。この培地の量は、樹脂の容量に対するタンパク質の濃度が大きく過剰であることを示し、樹脂上のタンパク質濃度がその事実上の最大であることを確実なものとしている。時間ゼロにおいて、10 mLのバッファーおよび樹脂を培地に添加した。さらに付加的に1 mLの水を、試験管を濯ぐために添加した。混合物を重さが既知のビーカー中で、冷却下で3時間攪拌した。その時、上清をワットマン47濾紙を含むブフナー漏斗で濾過した。上清の重さをはかり、0.5 mLの試料を回収した。

樹脂を濯ぎ、ビーカーに戻し、100 mL以下の50 mM酢酸バッファー、pH 5.2に接触させ、非特異的結合化合物を除去した。洗浄段階は25-30分続いた。この溶液を再び濾過し、試料を回収した。結合および洗浄画分の試料を活性について分析した。以下の表5は、洗浄後、全ての樹脂が、充填前に最低限の処理をされた液体培地中のスブチリシンに対する、非常に高い容量を有していることが判明した。

表 5

樹脂	スブチリシン容量 (mg/mL)	総タンパク質容量 (mg/mL)
MG 3	41.0-59.08 ^a	69.06-118 ^a
MG 3 a	48.08	---
MG 3 b	46.25	---

^a この樹脂については2回行った。

実施例 13

放射状流体カラムにおけるアミノカプロン酸リガンドを有するCDI活性化P e r z o l a セルロースを用いた粗発酵液体培地からのスブチリシンの回収

実施例12記載のMG 3 a 架橋樹脂を、実施例6記載のとおり調製した。

50 mLの放射状流体クロマトグラフィーカラム (Sepragen Corp., San Leandro, California) をこの樹脂で詰め、*Bacillus subtilis* 発酵液体培地からのスブチリシンの回収を実現するために、以下のように用いた：

液体培地処理

全液体培地を、冷凍されたSorvall遠心機で、4,500 rpm、30分間遠心した。遠心物の導電率は氷酢酸を用いてpH 5.2に調整した。希釈は行わなかった。培地の導電率は20 mモであった。スブチリシンは標的化合物であり、培地はまた、タンパク質を含む多様な無関係の化合物を有していた。

バッファー

平衡化バッファー：100 mM酢酸ナトリウム、pH 5.2 + 20 mモまでのNaCl

洗浄バッファー：20 mM酢酸ナトリウム、pH 5.2 + 20 mモまでのNaCl

溶出バッファー：100 mMグリシン、40%プロピレングリコール、8%蟻酸ナトリウム、pH 9、33 mモ

再生バッファー 0.1 M NaOH

460 mLの遠心した培地をpH 5.2および導電率20 mモでカラムに接触させた。動的容量を評価するために、カラムを意図的に過剰充填し、そのため通過および洗浄画分にも過剰の酵素が期待された。流速は10 mL/分であった。カラムを15 mL/分で、紫外線 (UV) 吸収がフルスケールの15%以下になるまで洗浄した。このために61カラム容量の洗浄バッファーを要した。カラムを、16カラム容量で5 mL/分で溶出した。洗浄後、樹脂のスブチリシン容量は31 mg/mLであった。実行の間を通して、圧力は4 psi以下であった。

タンパク質は上記の溶出バッファーを用いて、pHと導電率を増加させることにより溶出させた。94%の結合タンパク質が回収可能であった。0.5または1カラム容量の溶出画分を集めたが、集めた画分あたりのタンパク質 (スブチリ

シン) 濃度は図8に記載されている。最大のフラクション濃度は17.4 mg/mLであり、回収されたタンパク質の90%は3カラム容量以内で溶出した。

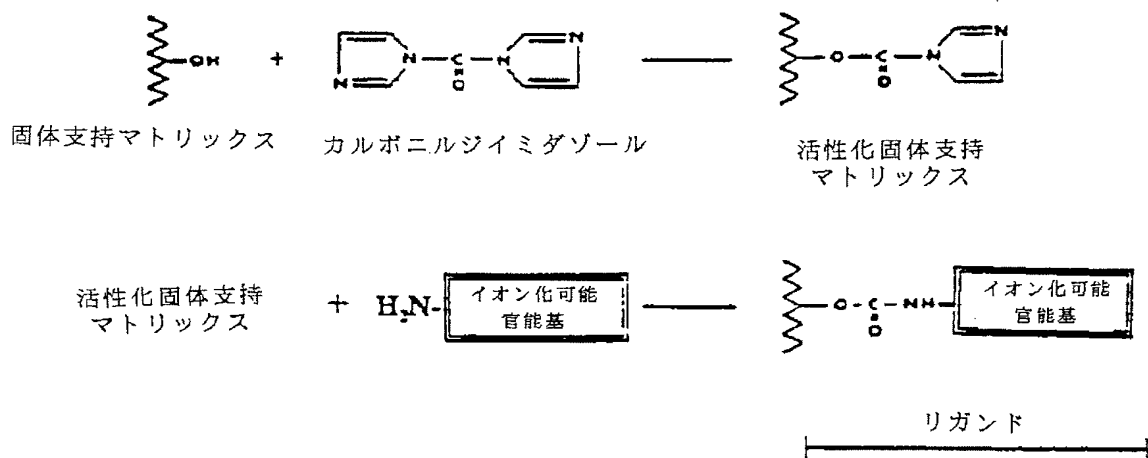
この工程は、最小の液体培地の前処理を伴う、複合発酵液体培地からの簡便で高いスプチリシン捕捉容量を示すものである。狭く、濃縮された溶出ピークでの定量的な回収もまた、この工程により可能である。

より少ないタンパク質を充填し、より短い洗浄工程を用いるという変更をした上で、上に示された手順に従うことにより、この化合物は、高い全体での収率で回収可能である。溶出バッファー中でのプロピレングリコールの使用は補助的であるが、完全な溶出を成すために必須ではない。この手順は、他の標的化合物の回収を可能とするために容易に変更され得る。

当業者にとっては、本発明の精神から離れることなく様々な変化および明白な本質の変更が可能であること、およびそのような変更は、以下の請求の範囲において示されている本発明の範囲内にあると考えられることは明白であろう。

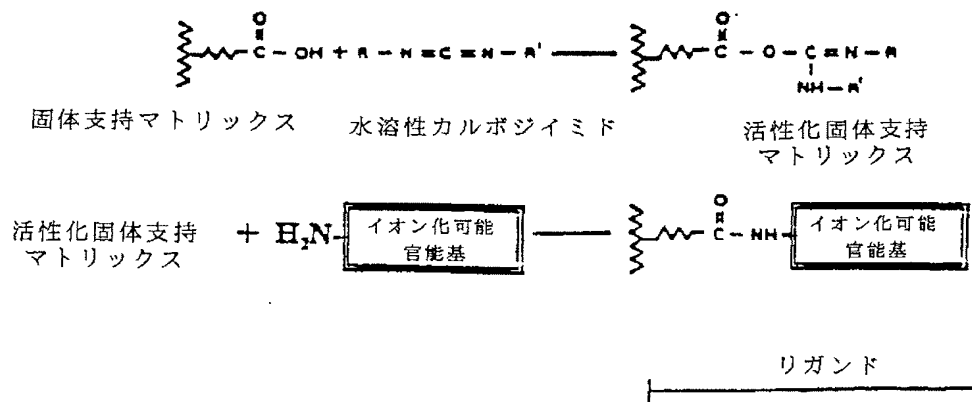
【図1】

図 1



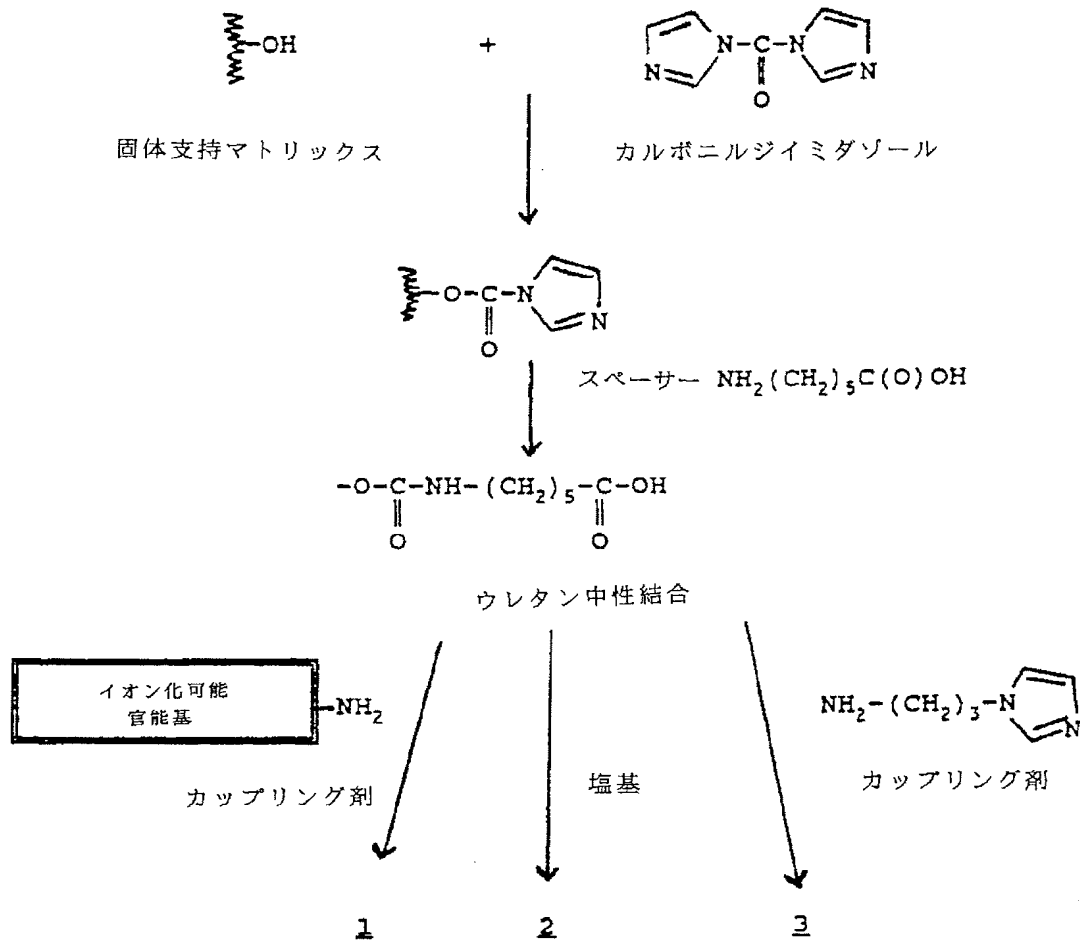
【図2】

図 2



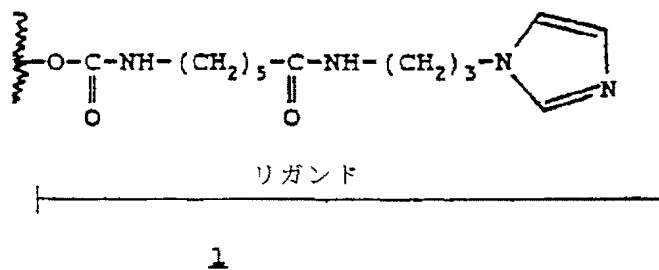
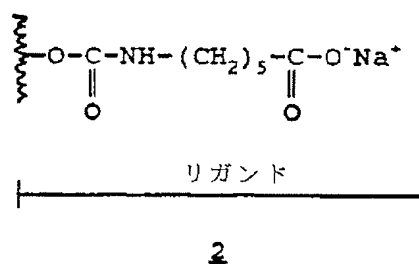
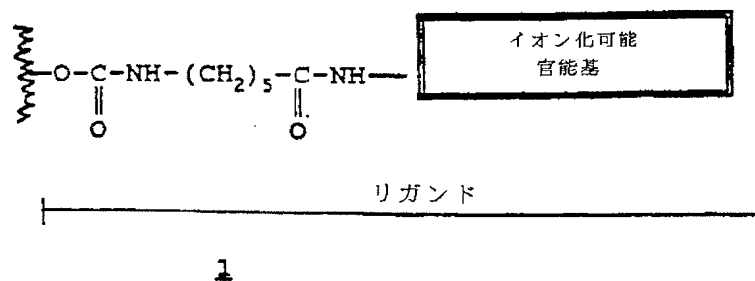
【図3】

図 3



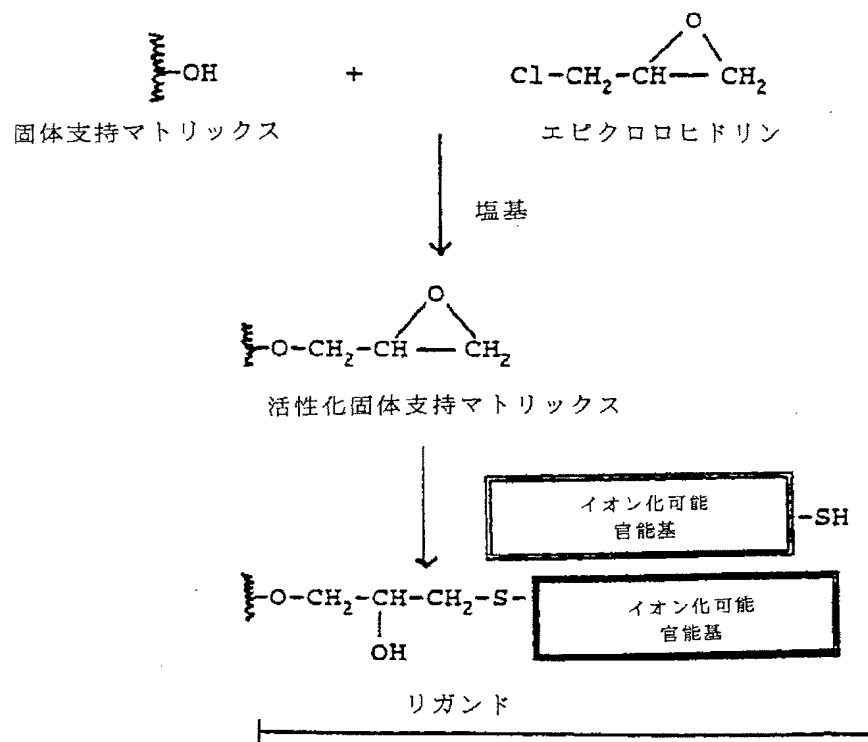
【図 4】

図 4



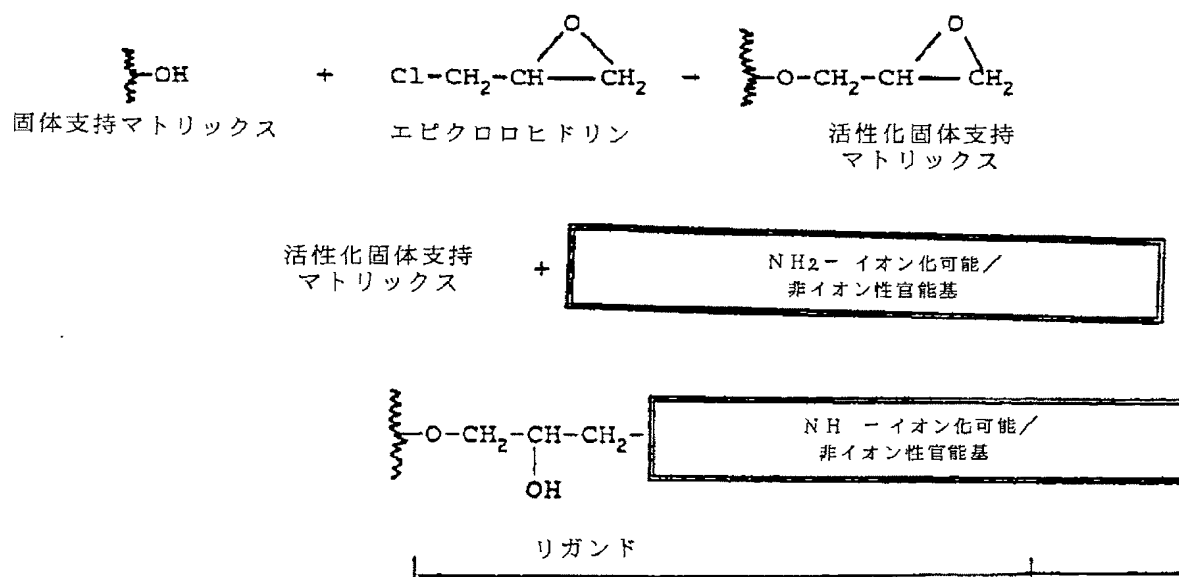
【図5】

図5



【図6】

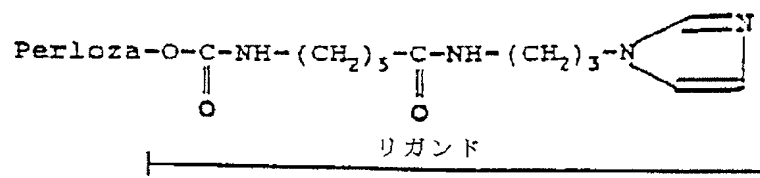
図6



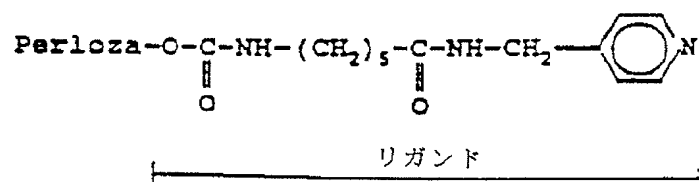
【図7】

図 7

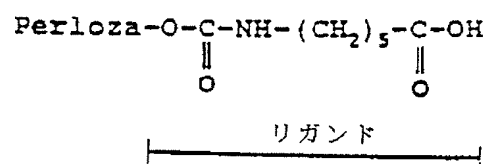
MG1



MG2

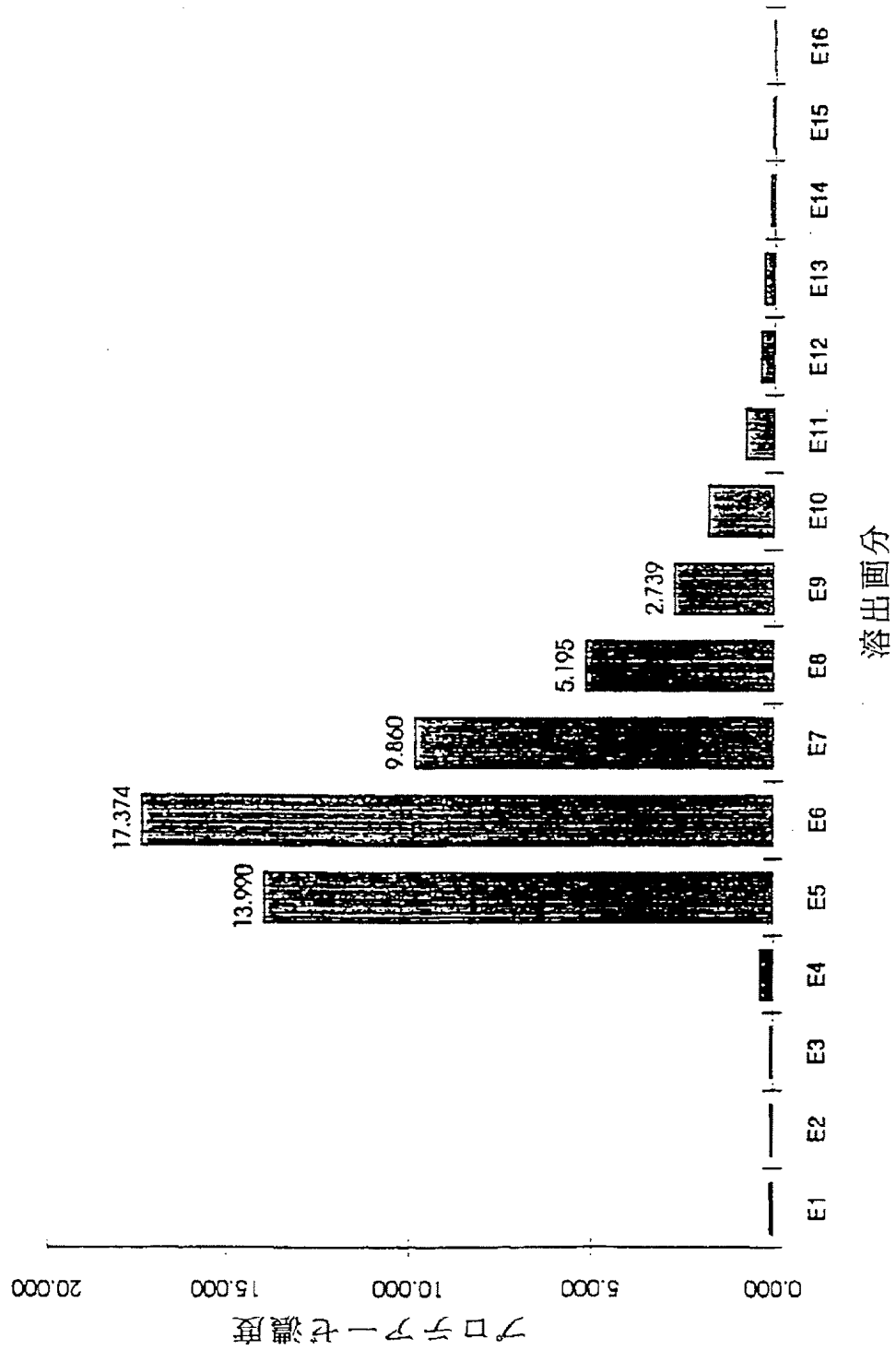


MG3



【図 8】

図 8 : 50ml放射状流体カラム中のMG3a樹脂からのスブチリシン溶出特性



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/HZ 95/00091																								
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 B01J20/32 G01N30/48 C07K1/00 B01J39/06 B01D15/08 C12N9/64 C12N9/56																										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.																										
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 B01J G01N C07K B01D C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>EP,A,0 172 579 (AMF INCORP.) 26 February 1986</td> <td>1,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>see page 16-31 see page 69; claim 54 ---</td> <td>22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP,A,0 180 563 (EXPLOATERINGS AB T.B.F.) 7 May 1986</td> <td>1,10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>see page 11-12; claims 1-9 ---</td> <td>7,9,17,21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP,A,0 337 144 (MERCK PATENT) 18 October 1989 see column 15-18; claims 1-9 ---</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>DD,A,280 333 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 4 July 1990 see page 1; claims 1-9 ---</td> <td>17-20,28</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-/-</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	EP,A,0 172 579 (AMF INCORP.) 26 February 1986	1,10	A	see page 16-31 see page 69; claim 54 ---	22	Y	EP,A,0 180 563 (EXPLOATERINGS AB T.B.F.) 7 May 1986	1,10	A	see page 11-12; claims 1-9 ---	7,9,17,21	A	EP,A,0 337 144 (MERCK PATENT) 18 October 1989 see column 15-18; claims 1-9 ---	1	X	DD,A,280 333 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 4 July 1990 see page 1; claims 1-9 ---	17-20,28	-/-		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
Y	EP,A,0 172 579 (AMF INCORP.) 26 February 1986	1,10																								
A	see page 16-31 see page 69; claim 54 ---	22																								
Y	EP,A,0 180 563 (EXPLOATERINGS AB T.B.F.) 7 May 1986	1,10																								
A	see page 11-12; claims 1-9 ---	7,9,17,21																								
A	EP,A,0 337 144 (MERCK PATENT) 18 October 1989 see column 15-18; claims 1-9 ---	1																								
X	DD,A,280 333 (AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR) 4 July 1990 see page 1; claims 1-9 ---	17-20,28																								
-/-																										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.																										
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family																										
Date of the actual completion of the international search 19 January 1996		Date of mailing of the international search report 26-01-1996																								
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wendling, J-P																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/NZ 95/00091

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,90 15865 (GENENCOR INTERN.) 27 December 1990 see page 8, line 24 - page 12, line 31 ---	17-21
X	US,A,4 981 961 (NGO) 1 January 1991 see column 5, line 25 - column 11, line 52 ---	26,27
X	DE,A,36 05 908 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO.) 2 October 1986 see page 8, paragraph 2 - page 15, paragraph 2 ---	17,28
A	FR,A,2 644 474 (ROHM) 21 September 1990 see page 4, line 24-26 ---	1,12
X	see page 16-17; claims 1-12 ---	26
X	WO,A,87 02273 (THE BRITISH PETROLEUM) 23 April 1987 see page 2, line 3-28 ---	26,27
A	J. OF CHROMATOGRAPHY, vol. 598, no. 1, 1 May 1992 AMSTERDAM, pages 7-13, XP 000265311 DANLIN WU 'EFFECTS OF STATIONARY PHASE LIGAND DENSITY ON.....PROTEINS' see page 7-13 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/NZ 95/00091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-172579	26-02-86	US-A- 4724207	09-02-88
		DE-A- 3586838	24-12-92
		JP-A- 61166861	28-07-86
EP-A-180563	07-05-86	SE-B- 452557	07-12-87
		JP-A- 61165661	26-07-86
		SE-A- 8405431	01-05-86
EP-A-337144	18-10-89	DE-A- 3811042	19-10-89
		AU-B- 3233189	05-10-89
		CA-A- 1330074	07-06-94
		CN-B- 1023298	29-12-93
		JP-A- 1310744	14-12-89
		US-A- 5453186	26-09-95
DO-A-280333		NONE	
WO-A-9015865	27-12-90	US-A- 5122467	16-06-92
		AU-B- 629656	08-10-92
		AU-B- 5852290	08-01-91
		CA-A- 2058453	14-12-90
		DE-D- 69018823	24-05-95
		DE-T- 69018823	07-12-95
		EP-A- 0477277	01-04-92
		JP-T- 5500301	28-01-93
		US-A- 5215908	01-06-93
US-A-4981961	01-01-91	CA-A- 2005917	08-03-91
		EP-A- 0491688	01-07-92
		JP-T- 5504978	29-07-93
		WO-A- 9103257	21-03-91
DE-A-3605908	02-10-86	JP-B- 6000800	05-01-94
		JP-A- 61197600	01-09-86
FR-A-2644474	21-09-90	DE-A- 3909018	20-09-90
		CH-A- 680668	15-10-92
		GB-A, B 2230010	10-10-90
		JP-A- 2283280	20-11-90
		US-A- 5326698	05-07-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/NZ 95/00091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8702273	23-04-87	AU-B- 581544	23-02-89
		AU-B- 6479086	05-05-87
		BE-A- 905617	17-04-87
		JP-T- 63501072	21-04-88
<hr/>			

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 9/56		C 1 2 N 9/56	
9/64		9/64	Z
G 0 1 N 30/88		G 0 1 N 30/88	J
// C 0 7 K 1/18		C 0 7 K 1/18	
C 0 8 F 220/06		C 0 8 F 220/06	
(72) 発明者	ハーディング, デイヴィッド アール ケー		
	ニュージーランド国 パルマーストン ノース カレッジ ストリート 296		
(72) 発明者	ベッカー, ナザニエル トッド		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94010 バーリンガム ヒルサイド ドライヴ 2116		
(72) 発明者	ブルサイス, ベン エイ		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94066 サン ブルノ ハンティングトン アヴェニュー 429		
(72) 発明者	スティール, ランドン エム		
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94131 サン フランシスコ マルタ ドライヴ 70		